

**Einfluss von 4-Methylumbelliferon, einem  
Hyaluronsäure-Syntheseinhibitor, auf  
atherosklerotisch bedingte Gefäßveränderungen  
ApoE-defizienter Mäuse**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.  
des Fachbereiches Biologie und Geographie  
an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Nadine Nagy  
aus Solingen

Oktober 2009

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Pharmakologie des Universitätsklinikums Essen der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. J.W. Fischer

2. Gutachter: Prof. Dr. V. Jendrossek

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. D. Hoffmann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Atherosklerose.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die Gefäßfunktion.....	2
1.1.2	Die Entstehung der Atherosklerose .....	2
1.1.3	Die extrazelluläre Matrix .....	3
<b>1.2</b>	<b>Die endotheliale Glykokalyx.....</b>	<b>5</b>
1.2.1	Die Zusammensetzung der endothelialen Glykokalyx.....	5
1.2.2	Die Funktion der endothelialen Glykokalyx .....	6
<b>1.3</b>	<b>Hyaluronsäure.....</b>	<b>9</b>
1.3.1	Struktur und Synthese der Hyaluronsäure .....	9
1.3.2	Hyaluronidasen.....	10
1.3.3	Hyaluronsäurerezeptoren und Hyaladhärine.....	10
1.3.4	Funktion der Hyaluronsäure.....	11
1.3.5	Hyaluronsäure assoziierte Erkrankungen .....	12
<b>1.4</b>	<b>4-Methylumbelliferon .....</b>	<b>14</b>
1.4.1	Ursprung, chemische Struktur und klinische Anwendung .....	14
1.4.2	Wirkmechanismus .....	15
1.4.3	Bisherige Anwendung von 4-MU in der Forschung .....	16
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Puffer und Lösungen.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Farbstoffe und Färbelösungen.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3</b>	<b>Substanzen und Komplettpakete.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4</b>	<b>Antikörper.....</b>	<b>22</b>
<b>2.5</b>	<b>Primer Real Time.....</b>	<b>23</b>
<b>2.6</b>	<b>Arzneistoffe .....</b>	<b>24</b>
<b>2.7</b>	<b>Material, Geräte und Software.....</b>	<b>24</b>
<b>2.8</b>	<b>Tiere und Futtermischungen.....</b>	<b>27</b>
2.8.1	Tiere .....	27
2.8.2	Futtermischungen.....	27
<b>2.9</b>	<b>Studiendesign .....</b>	<b>28</b>
2.9.1	Studie zur Kurz-, Intermediär- und Langzeitbehandlung mit 4-MU auf die Atherosklerose .....	28
2.9.2	Studie zur Behandlung mit 4-MU auf präexistente Atherosklerose.....	28
2.9.3	Einfluss von 4-MU im Modell der Neointimahyperplasie .....	29

<b>2.10</b>	<b>Probenentnahme für biochemische, histologische und molekularbiologische Analysen.....</b>	<b>30</b>
2.10.1	Plasmapräparation.....	30
2.10.2	Organentnahme für histologische Analysen.....	30
2.10.3	Entnahme der Aorta für molekularbiologische Untersuchungen.....	30
<b>2.11</b>	<b>Einbettung und Aufarbeitung des Probenmaterials .....</b>	<b>31</b>
2.11.1	Paraffin-Einbettung und Aufarbeitung .....	31
2.11.2	Kryo-Einbettung und Aufarbeitung .....	31
<b>2.12</b>	<b><i>En face</i> Färbung der Aorta .....</b>	<b>32</b>
<b>2.13</b>	<b>Histologische Färbungen .....</b>	<b>32</b>
2.13.1	Hämatoxylin und Eosin (H&E) .....	32
2.13.2	Kollagen .....	33
<b>2.14</b>	<b>Immunhistologische Färbungen .....</b>	<b>33</b>
<b>2.15</b>	<b>Aufnahme und Auswertung der Färbungen.....</b>	<b>34</b>
2.15.1	Aufnahme der histologischen und immunhistologischen Färbungen.....	34
2.15.2	Aufnahme der Aorta.....	35
2.15.3	Morphometrische und quantitative Auswertung der Färbungen .....	35
<b>2.16</b>	<b>Hyaluronsäure Quantifizierung im Plasma .....</b>	<b>36</b>
<b>2.17</b>	<b>Real-time-quantitative PCR (RTq-PCR) .....</b>	<b>36</b>
2.17.1	RNA Präparation aus murinen Aorten.....	36
2.17.2	Quantifizierung der mRNA mittels RTq-PCR.....	36
<b>2.18</b>	<b>Blutdruckmessung.....</b>	<b>37</b>
<b>2.19</b>	<b>Messung der Endothelfunktion an isolierten murinen Aorten.....</b>	<b>37</b>
<b>2.20</b>	<b>Bestimmung der Blutungszeit .....</b>	<b>39</b>
<b>2.21</b>	<b>Messung der Thromboseneigung.....</b>	<b>39</b>
<b>2.22</b>	<b>Plättchenaktivierung.....</b>	<b>40</b>
<b>2.23</b>	<b>Endogenes Thrombinpotential.....</b>	<b>41</b>
<b>2.24</b>	<b>Elektronenmikroskopische Darstellung der Glykokalyx .....</b>	<b>42</b>
<b>2.25</b>	<b>Erzeugung einer Neointimahyperplasie durch Ligatur der <i>Arteria carotis communis</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>2.26</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1</b>	<b>Einfluss von Kurz-, Intermediär- und Langzeitbehandlung mit 4-MU auf die Entstehung der Atherosklerose.....</b>	<b>45</b>
3.1.1	4-MU steigert den Plaquebesatz der Aorta und des Aortenursprungs.....	45
3.1.2	4-MU reduziert die HA-Konzentration im Plasma.....	47
3.1.3	4-MU senkt den HA-Gehalt im Aortenursprung.....	47
3.1.4	RHAMM Expression im Aortenursprung .....	49



<b>3.2</b>	<b>4-MU steigert die Inflammation während der Entstehung der Atherosklerose.....</b>	<b>50</b>
3.2.1	4-MU verändert den Zeitverlauf der Makrophagenexpression im Aortenursprung.....	50
3.2.2	4-MU erhöht die Expression von COX-2 im Aortenursprung.....	52
<b>3.3</b>	<b>4-MU hat keinen Einfluss auf glatte Muskelzellen und die extrazelluläre Matrix .....</b>	<b>53</b>
<b>3.4</b>	<b>Einfluss einer frühen Intervallbehandlung mit 4-MU auf die Atherosklerose.....</b>	<b>58</b>
3.4.1	Die 4-MU Behandlung in der Phase der akuten Inflammation hat keinen Einfluss auf Inflammation und HA-Expression .....	59
3.4.2	Die 4-MU Behandlung nach der Phase der akuten Inflammation führt zu einer gesteigerten Atherosklerose .....	61
<b>3.5</b>	<b>Die HAS-Genexpression wird durch 4-MU nicht beeinflusst .....</b>	<b>63</b>
<b>3.6</b>	<b>4-MU steigert den Blutdruck .....</b>	<b>65</b>
<b>3.7</b>	<b>4-MU verschlechtert die Endothelfunktion.....</b>	<b>66</b>
<b>3.8</b>	<b>4-MU hat eine pro-thrombotische Wirkung .....</b>	<b>69</b>
3.8.1	4-MU steigert die Thromboseneigung .....	69
3.8.2	4-MU reduziert die Blutungszeit.....	70
3.8.3	Analyse der Plättchenaktivierung.....	71
3.8.4	Endogenes Thrombinpotential .....	73
<b>3.9</b>	<b>4-MU reduziert die endotheliale Glykokalyx.....</b>	<b>74</b>
<b>3.10</b>	<b>4-MU hat keinen Einfluss auf die Neointima-Hyperplasie .....</b>	<b>78</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>82</b>
<b>4.1</b>	<b>Einfluss von Hyaluronsäure auf die Atherosklerose.....</b>	<b>83</b>
<b>4.2</b>	<b>Einfluss des Hyaluronsäure-Syntheseinhibitors 4-MU auf die Atherosklerose.....</b>	<b>84</b>
<b>4.3</b>	<b>Einfluss von Hyaluronsäure auf die Inflammation während der Atherosklerose.....</b>	<b>86</b>
4.3.1	Einfluss von 4-MU auf die Inflammation während der Atherosklerose.....	87
4.3.2	Einfluss von 4-MU auf präexistente Atherosklerose .....	89
<b>4.4</b>	<b>Einfluss von 4-MU auf die zelluläre Zusammensetzung der atherosklerotischen Läsionen .....</b>	<b>90</b>
<b>4.5</b>	<b>Auswirkungen einer zerstörten Glykokalyx .....</b>	<b>95</b>
<b>4.6</b>	<b>Auswirkungen der zerstörten Glykokalyx auf die Inflammation.....</b>	<b>98</b>
<b>4.7</b>	<b>Einfluss von 4-MU auf die Endothelfunktion.....</b>	<b>100</b>
<b>4.8</b>	<b>Einfluss von 4-MU auf die Thromboseneigung.....</b>	<b>101</b>

---

4.8.1	Einfluss von 4-MU auf die Plättchenaktivierung und das endogene Thrombinpotential .....	103
4.9	<b>Einfluss von 4-MU auf die Neointimahyperplasie .....</b>	<b>103</b>
4.10	<b>Potential des 4-MU für therapeutische Zwecke .....</b>	<b>104</b>
4.11	<b>Ausblick.....</b>	<b>106</b>
5	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>107</b>
6	<b>Summary .....</b>	<b>108</b>
7	<b>Literatur.....</b>	<b>109</b>
8	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>126</b>
8.1	<b>Fachzeitschriften .....</b>	<b>126</b>
8.2	<b>Kongressbeiträge .....</b>	<b>126</b>
9	<b>Danksagung.....</b>	<b>128</b>
10	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>129</b>
11	<b>Eidesstattliche Erklärungen .....</b>	<b>130</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

4-MU	4-Methylumbelliferon
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ApoE	Apolipoprotein E
BSA	bovines Serumalbumin
BrdU	Bromdesoxyuridin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cGMP	<i>cyclic guanosinmonophosphat</i>
COX-2	Cyclooxygenase-2
Cy3	Cyanin 3
DAB	Diaminobenzidin
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
Ec	Endothelzelle
EC <sub>50</sub>	halbmaximal effektive Konzentration
EC-SOD	extrazelluläre Superoxid Dismutase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	Elektronenmikroskopie
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETP	endogenes Thrombinpotential
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gx	Glykokalyx
HA	Hyaluronsäure
HAbP	Hyaluronsäure-Bindeprotein
HAS	Hyaluronsäure-Synthase
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HYAL	Hyaluronidase

I $\alpha$ I	<i>inter-<math>\alpha</math>-inhibitor</i>
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
INN	<i>international nonproprietary name</i>
IUPAC	<i>international union of pure and applied chemistry</i>
JPEG	<i>Joint Photographic Experts Group</i>
L	Lumen
Lb	<i>Lamina basalis</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LE	<i>Lamina elastica externa</i>
LI	<i>Lamina elastica interna</i>
Lv	<i>Lumen vascularis</i>
M	Media
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N	Nucleus
NO	Stickstoffmonoxid
NI	Neointima
P	Plasmamembran
PAP	plättchenarmes Plasma
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PECAM	<i>platelet/endothelial cell adhesion molecule</i>
PFA	Paraformaldehyd
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin-E <sub>2</sub>
PRP	plättchenreiches Plasma
RHAMM	<i>receptor of hyaluronan mediated motility</i>
Rhod-red X	Rhodamin-red X
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
RTq-PCR	quantitative reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SEM	<i>standard error mean</i>
SLRP	<i>small leucine-rich proteoglycan</i>

SMC	<i>smooth muscle cells</i>
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TIF	<i>tagged image file</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	<i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSG-6	<i>tumor necrosis factor alpha stimulated gene-6</i>
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glukuryltransferase
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Atherosklerose

Die Atherosklerose ist die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen und steht seit mehreren Jahrzehnten im Mittelpunkt der medizinischen und biochemischen Forschung. Die Atherosklerose ist eine chronische Entzündung der Gefäßwand, ausgelöst durch Interaktionen zwischen oxidativ veränderten Lipoproteinen mit Entzündungszellen und anderen zellulären Gefäßbestandteilen, wie z.B. glatten Muskelzellen<sup>1</sup>. Diese Gefäßentzündung führt über Jahre hinweg zur Ausbildung atherosklerotischer Läsionen in der Gefäßwand. Die atherosklerotische Erkrankung verläuft schleichend und ist in den ersten Jahren symptomlos, erst die Anzeichen einer manifesten Atherosklerose werden bemerkt. Die manifeste Atherosklerose ist charakterisiert durch Auftreten von *Angina Pectoris*, Thrombose, Ischämie, einem Schlaganfall oder einem Myokardinfarkt. Auslöser sind Rupturen der atherosklerotischen Läsionen, die im Gefäß zur Thrombusbildung und somit zum Gefäßverschluss mit den oben genannten Krankheitsverläufen führen können<sup>2</sup>. Viele Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Hypertonie, Rauchen, *Diabetes mellitus* oder Immunreaktionen des Körpers auf bestimmte Infektionen<sup>3</sup> schädigen das Endothel und vermindern die Vasodilatation der Gefäße, wodurch die Progression der Atherosklerose begünstigt wird.

Der initiale Schritt in der Entstehung einer Atherosklerose ist eine endotheliale Dysfunktion. Diese Verschlechterung der Endothelfunktion führt zu einer verminderten Synthese vasoaktiver Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin<sup>4</sup>. Durch die verminderte Verfügbarkeit dieser vasorelaxierenden Substanzen wird die Relaxationsfähigkeit der Gefäße stark eingeschränkt und in der Konsequenz der Blutdruck gesteigert. Wenn eine vorliegende Gefäßstenose als Folge der Atherosklerose frühzeitig erkannt wird, kann diese operativ durch eine Ballon-Angioplastie beseitigt werden. Bei einer Ballondilatation kommt es jedoch vielfach durch die starke Dehnung der arteriellen Gefäßwand zu Verletzungen des Endothels und der darunterliegenden Gewebeschichten. Daraus resultiert häufig eine erneute Gefäßstenose mit Gefäßwandremodeling und Neointimabildung<sup>5, 6</sup>.

### 1.1.1 Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die Gefäßfunktion

Gesunde arterielle Gefäße sind aus drei Schichten aufgebaut. Die äußerste Schicht ist die *Tunica adventitia* (Adventitia), die aus Bindegewebe, Kollagengittern und Gefäßwandnerven besteht. Über die Adventitia hält das Gefäß den Kontakt zum umliegenden Gewebe. Die *Tunica media* (Media) ist die mittlere Schicht und bestimmt durch Kontraktion und Relaxation der eingebetteten glatten Muskelzellen und elastischen Fasern die Weite der Gefäße. Die Media ist von der Adventitia durch die *Lamina elastica externa* abgetrennt. Die innerste Schicht, die *Tunica intima* (Intima) besteht aus einer einschichtigen Lage von Endothelzellen, sowie der *Lamina elastica interna*, welche sich zwischen dem vaskulären Endothel und der darüberliegenden Media befindet. Das Endothel selbst stellt eine physiologische Grenze zwischen Gefäßwand und Blut dar. Darüber hinaus erfüllt die Endothelschicht wichtige Steuerungsfunktionen, wie die Regulation des Gefäßtonus, der Hämostase und der Angiogenese. Innerhalb der Gefäßwand wird Stickstoffmonoxid (NO) von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) in den Endothelzellen gebildet. Die Scher- und Dehnungskräfte, die das vorbeiströmende Blut auf das Endothel ausübt, fungieren als physiologischer Reiz für die vaskuläre Aktivierung der NO-Produktion<sup>7</sup>. Das gebildete NO diffundiert frei durch die Membranen und wirkt als endogener Botenstoff. Die wichtigste physiologische Wirkung von Stickstoffmonoxid ist eine schnell einsetzende Vasodilatation, ausgelöst durch Erhöhung des cGMP-(zyklisches Guanosinmonophosphat)-Spiegels in den glatten Gefäßmuskelzellen der Media<sup>8</sup>. Darüber hinaus vermittelt NO auch antiaggregatorische Effekte auf Thrombozyten<sup>9</sup> und reduziert die Adhäsion von Leukozyten an die Gefäßwand<sup>10</sup>. Desweiteren werden NO antioxidative<sup>11, 12</sup> und antiproliferative Effekte zugeschrieben. Durch pathophysiologische Veränderungen wie Bluthochdruck, Koronare Herzkrankheit oder *Diabetes mellitus* wird die Bioverfügbarkeit von NO verringert und es kommt zu einer endothelialen Dysfunktion<sup>13</sup>.

### 1.1.2 Die Entstehung der Atherosklerose

Durch die endotheliale Dysfunktion kommt es während der Atherosklerose zu einem strukturellen Umbau der Gefäßwand. Durch die Schädigung des Endothels wird die Vasodilatation eingeschränkt und die Permeabilität des Endothels für Lipoproteine

und andere Plasmabestandteile gesteigert. Durch den verstärkten hämodynamischen Stress und Lipidinfiltration kommt es zu einer Endothelaktivierung und dadurch zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin, P-Selektin) auf der Endothelzelloberfläche. Die vermehrte Expression von P-Selektin vermittelt die initiale Phase der Monozytenadhäsion an der Oberfläche des Endothels. Die anschließende sichere Adhärenz erfolgt durch Bindung an Integrine oder ICAM-1<sup>14, 15</sup>. Die Transmigration der gebundenen Monozyten in den subendothelialen Raum und die Differenzierung zu Makrophagen wird durch subendotheliales oxidiertes LDL induziert. Durch die Aufnahme von oxidiertem LDL entstehen so genannte Schaumzellen. Die eingewanderten Makrophagen sezernieren, ebenso wie die Schaumzellen, proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren<sup>2, 16-18</sup>. Durch die vermehrte Freisetzung von Entzündungsmediatoren wird die Transformation der glatten Muskelzellen der Media von einem kontraktilen und ruhenden zu einem sekretorischen Phänotyp induziert<sup>19</sup>. Dieser Übergang der glatten Gefäßmuskelzellen in den sekretorischen Phänotyp geht mit einer gesteigerten Proliferation, Migration sowie einer verstärkten Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Bestandteilen der extrazellulären Matrix einher.

### **1.1.3 Die extrazelluläre Matrix**

Die extrazelluläre Matrix (EZM) nimmt eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der Atherosklerose ein<sup>20</sup>, da sie die Invasion und Retention von Entzündungszellen, die Lipidakkumulation, die Wirkung von Wachstumsfaktoren, die Kalzifizierung, thromboembolische Ereignisse und den Phänotyp der vaskulären glatten Muskelzellen beeinflusst<sup>21, 22</sup>. Die EZM wird aus einem Netzwerk verschiedener Makromoleküle gebildet. Ein wesentlicher Bestandteil sind verschiedene Kollagene, die über Integrinbindung die intrazelluläre Signaltransduktion über den Fokalen Adhäsionskomplex auslösen und so die Zellmigration und Zellproliferation beeinflussen. Neben den Kollagenen enthält die EZM diverse Glykoproteine (Fibronektin, Tenascin), die zum Beispiel als Adhäsionsmoleküle agieren und sowohl Zell-Matrix als auch Matrix-Matrix Interaktionen vermitteln können. Eine weitere große Gruppe von EZM-Molekülen bilden die Proteoglykane. Diese hochgradig glykosylierten Proteine bestehen aus einem Kernprotein und kovalent gebundenen sulfatierten Glykosaminoglykan-Ketten (GAG). Durch die Bindung der Proteoglykane an Kollagen und verschiedene andere Matrixbestandteile über ihre GAG-



Seitenketten und Kernproteine tragen die Proteoglykane maßgeblich zur Zusammensetzung und Stabilität der EZM bei. Die Proteoglykane Biglykan und Decorin gehören zu den kleinen Leucin-reichen Proteoglykanen (SLRP) und sind neben Versikan und Perlecan die am besten untersuchten Proteoglykane in atherosklerotischen Plaques<sup>23, 24</sup>. Insbesondere durch ihre regulatorische Wirkung auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen beeinflussen die beiden Proteoglykane Biglykan und Decorin entscheidend die Progression der Atherosklerose<sup>25, 26</sup>.

## **1.2 Die endotheliale Glykokalyx**

### **1.2.1 Die Zusammensetzung der endothelialen Glykokalyx**

Die endotheliale Glykokalyx ist eine kohlenhydratreiche Schicht des vaskulären Endothels aus transmembranären Proteoglykanen und Rezeptor-gebundenen Glykoproteinen. Die löslichen Komponenten, unter anderem Proteoglykane oder andere Proteine, sind in der Glykokalyx eingebettet oder werden an die Oberfläche dieses Netzwerkes gebunden. Ein wesentlicher Anteil der basalen Glykokalyx wird durch das Endothel gebildet, ein weiterer Teil wird in Form von löslichen Plasmabestandteilen aus dem Blutstrom rekrutiert. Über die genaueren Strukturen ist bisher wenig bekannt. Es ist bekannt, dass die Proteoglykane über diese löslichen Komponenten aneinander und an andere Proteine binden können<sup>27, 28</sup>. Durch Interaktionen zwischen Proteoglykanen und Proteinen wird so ein verzweigtes Netzwerk ausgebildet, dass die Stabilität der Glykokalyx erhöht. Zwischen der Glykokalyx und dem Blutfluss herrscht ein dynamisches Gleichgewicht aus Biosynthese und Ablösung durch Scherstress. Die Glykokalyx unterliegt den permanenten Veränderungen des Blutflusses, was sich in einem fortwährenden Umbau des Netzwerkes und letztlich in der Dicke der Glykokalyx widerspiegelt<sup>29</sup>. Über die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten der Glykokalyx kann keine präzise pauschalisierte Aussage getroffen werden, da die Zusammensetzung dynamisch reguliert wird. Die endotheliale Oberflächenschicht wird daher als Ganzes betrachtet<sup>30</sup>.

Das Basisnetzwerk der Glykokalyx wird von den Proteoglykanen gebildet. Die einzelnen Proteoglykane unterscheiden sich in ihrer Anzahl an GAG-Ketten<sup>31</sup> welche auch die Größe bestimmen. Bisher sind fünf unterschiedliche Typen von GAG-Ketten bekannt, dazu zählen Heparan-, Chondroitin-, Dermatan- und Keratansulfat sowie die unsulfatierte Hyaluronsäure. Die endotheliale Glykokalyx besteht überwiegend aus Heparansulfaten<sup>32</sup>, gefolgt von Chondroitin- und Dermatansulfat<sup>33, 34</sup>. Die Hyaluronsäure (siehe 1.3) ist ein weiterer wichtiger Bestandteil der Glykokalyx. Die Proteoglykane unterscheiden sich des Weiteren durch ihren Bindungsort. Syndecan und Glypican sind fest an der Zellmembran verankert<sup>35, 36</sup>, wohingegen Perlecan und Biglykan in den extrazellulären Raum sezerniert werden. Die nicht verankerten

Proteoglykane verbleiben entweder durch Bindung an andere Bestandteile in der Glykokalyx oder diffundieren in den Blutstrom<sup>37, 38</sup>.

Bestimmte Glykoproteine und Rezeptoren wie Selektine, Integrine und Immunglobuline werden ebenfalls als Bestandteile des Basisnetzes angesehen. Die Expression der Glykoproteine, wie z.B. E-Selektin und P-Selektin, auf der Zellmembran der Endothelzellen ist abhängig vom Aktivierungszustand der Zelle. Viele Integrine sind an der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion beteiligt<sup>39</sup>. Integrine kommen in Leukozyten, Plättchen und in Endothelzellen vor. Die Endothelzellen exprimieren zum Beispiel das Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , welches als einer der Hauptoberflächenrezeptoren der Endothelzellen an der Plättchen-Endothelzell-Interaktion beteiligt ist<sup>40</sup>. Die meisten anderen in den Endothelzellen vorkommenden Integrine binden an Liganden der extrazellulären Matrix und sind für die Interaktionen mit Laminin, Kollagen und Fibronektin verantwortlich<sup>41</sup>.

Von der Familie der Immunglobuline sind ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 und PECAM-1 die bekanntesten Vertreter welche als Liganden für Integrine auf Leukozyten und Plättchen agieren. Diese Adhäsionsmoleküle steuern so das Leukozyten-„*Homing*“. Viele dieser Adhäsionsrezeptoren sind auf eine Aktivierung durch Zytokinstimulation angewiesen, so zum Beispiel VCAM-1, wohingegen andere wie PECAM-1 basal exprimiert werden. Die ICAM-1 Expression ist in Endothelzellen zwar basal vorhanden, wird aber durch Zytokinstimulation deutlich gesteigert<sup>42</sup>.

### 1.2.2 Die Funktion der endothelialen Glykokalyx

Durch ihre Lage zwischen dem Blutstrom und dem Endothel ist die Glykokalyx ein wichtiger Faktor, der die vaskuläre Permeabilität bestimmt<sup>43, 44</sup>. In einer Untersuchung an Rattenarterien mit fluoreszenzmarkierten Dextranen verschiedener Molekulargewichte konnte eine Diffusionsbarriere mit einer Stärke von bis zu mehreren  $\mu\text{m}$  oberhalb der Endothelzellschicht nachgewiesen werden. Diese Schicht ist identisch mit der endothelialen Glykokalyx und ist bereits für Proteine mit einem Molekulargewicht  $> 50 \text{ kDa}$  nahezu unpassierbar<sup>45</sup>. Zusätzlich weist die Glykokalyx durch ihren hohen Anteil an GAGs eine stark negative Ladung auf und verhindert so die direkte Interaktion geladener Plasmaproteine mit dem Endothel. Durch eine Schädigung oder Degradation verliert die Glykokalyx ihre Barrierefunktion, die eine unmittelbare Interaktion sowohl zellulärer als auch löslicher Bestandteile des Blutes mit der Endothelschicht verhindert, weitgehend ein. Daraus resultiert ein direkter

Kontakt Endothel-assoziiierter Adhäsionsmoleküle mit dem Blutstrom und letztlich eine verstärkte Adhäsion und Infiltration von Leukozyten in das vaskuläre Gewebe. Dies ist insbesondere für die Atherosklerose-Entstehung von Bedeutung, da die Adhäsion und Migration von Makrophagen durch die Gefäßwand als initialer Schritt der Atherogenese angesehen wird<sup>46, 47</sup>.

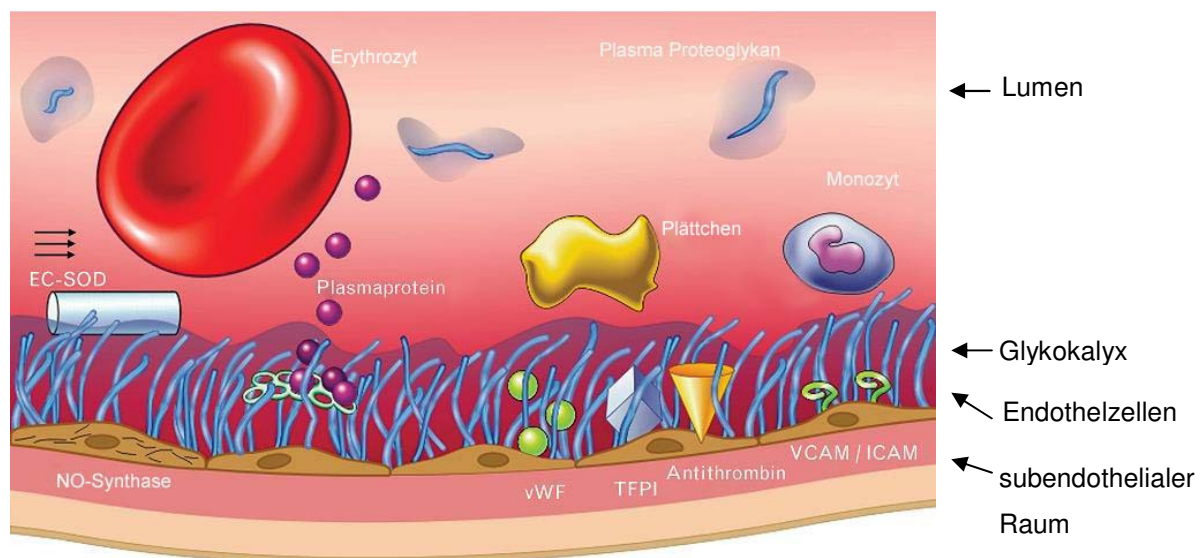
Das Endothel ist permanent mechanischer Verformung durch den Blutstrom ausgesetzt. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese mechanischen Kräfte, speziell der Scherstress, Morphologie und Funktion der Endothelzellen beeinflusst<sup>48, 49</sup>. Florian *et al.* und Mochizuki *et al.* konnten nachweisen, dass eine Schädigung der Glykokalyx durch Entfernung der enthaltenen Proteoglykane oder Glukosaminoglykane die Reaktivität des Endothels auf Scherstress stark verringert<sup>50, 51</sup>. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Dicke der Glykokalyx durch Störungen der Hämodynamik, zum Beispiel vor Gefäßverzweigungen oder durch atherosklerotische Plaques, drastisch reduziert wird<sup>52</sup>. Diese und weitere Studien zeigten, dass die Glykokalyx eine große Rolle in der Mechanotransduktion spielt und dass ihre Zusammensetzung Scherstress abhängig ist<sup>53</sup>.

Die Eigenschaften der endothelialen Glykokalyx und ihre Dicke werden entscheidend durch Zusammensetzung und Länge der GAG-Ketten der enthaltenen Proteoglykane beeinflusst. Die Eigenschaften der GAG-Seitenketten kann durch Epimerisation, Elongation oder den Grad der Sulfatierung gesteuert werden, wodurch sich Ladungszustand und Oberflächenstruktur der Glykokalyx verändern. Diese Veränderungen in der Zusammensetzung und der Ladungsverteilung der Glykokalyx ändert auch ihre Affinität zu verschiedenen Plasmabestandteilen. Durch eine Bindung an die Strukturen der Glykokalyx wird unter anderem die Aktivität von Wachstumsfaktoren (VEGF<sup>54</sup>), Enzymen (EC-SOD<sup>40</sup>) und einer Reihe von Interleukinen reguliert. Die Bindung von Plasmaproteinen kann die lokale Zusammensetzung der Glykokalyx auf verschiedene Weise beeinflussen. Zum einen kann durch die Bindung ein Konzentrations-Effekt eintreten, der lokal zu einer starken Anreicherung von Enzymen oder Wachstumsfaktoren in der Glykokalyx führt<sup>55</sup>, zum anderen können aus dem Plasma rekrutierte Proteine die vasoprotektive Barriere-Wirkung der Glykokalyx unterstützen<sup>56</sup>.

Viele Plasmamoleküle entfalten ihre volle Funktion erst durch eine Bindung an bestimmte Proteoglykanstrukturen der Glykokalyx. Von besonderer Bedeutung sind dabei Proteine wie Antithrombin III<sup>56</sup> oder Heparin Kofaktor II<sup>57</sup>, die durch die Inhibition pro-koagulatorischer Proteine wie Thrombin oder Faktor Xa<sup>58</sup> direkt die Blutgerinnung beeinflussen. Die Modulation vielfältiger vaskulärer Funktionen und insbesondere antikoagulatorischer Faktoren belegen die Bedeutung der endothelialen Glykokalyx für die Steuerung vasoprotektiver und thrombotischer Prozesse<sup>59</sup>.

Eine Veränderung der endothelialen Glykokalyx resultiert in einem Verlust der vasoprotektiven Eigenschaften und trägt somit zur Pathophysiologie verschiedener vaskulärer Erkrankungen, insbesondere der Atherosklerose<sup>60</sup>, bei.

In der nachfolgenden Abbildung 1-1 werden noch einmal die wichtigsten physiologischen Funktionen der Glykokalyx zusammengefasst und anhand des Schaubilds verdeutlicht.

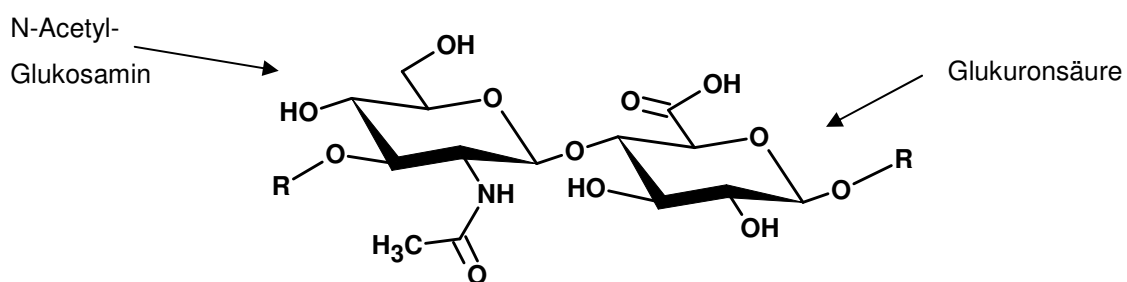


**Abbildung 1-1** Darstellung der physiologischen Rolle der Glykokalyx in einem intakten Gefäß. Die endotheliale Glykokalyx reguliert die Aktivität der NO-Synthase, beherbergt die EC-SOD (extrazelluläre Superoxid Dismutase), dient als physikalische Barriere für Makromoleküle zwischen Lumen und Endothelzellen und beinhaltet Plasma- und Lipoproteine. Des Weiteren reduziert die Glykokalyx die Anheftung von Plättchen und Leukozyten an die Endothelzellen (modifiziert nach Nieuwdorp *et al.*<sup>60</sup>).

## 1.3 Hyaluronsäure

### 1.3.1 Struktur und Synthese der Hyaluronsäure

Die Hyaluronsäure (HA) ist ein bedeutender Bestandteil der extrazellulären Matrix und besteht aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten die aus  $\beta$ -1,3 D-Glukuronsäure und  $\beta$ -1,4 N-Acetyl-Glukosamin zusammengesetzt sind<sup>61</sup>. Die native HA hat eine Kettenlänge von 2 bis 25  $\mu\text{m}$ , ein Molekulargewicht von  $10^5$  bis  $10^7$  Da und besteht aus 2000 bis 25000 Disaccharideinheiten<sup>62</sup>.



**Abbildung 1-2** Dargestellt ist die Strukturformel der Hyaluronsäure. Die Hyaluronsäure besteht aus N-Acetyl-Glukosamin und Glukuronsäure, welche  $\beta$ -1,4 bzw.  $\beta$ -1,3 verknüpft sind. Diese Einheiten werden alternierend angeordnet, die Struktur der Hyaluronsäure ist unverzweigt.

Die Hyaluronsäure wird im Gegensatz zu den anderen Glykosaminoglykanen nicht sulfatiert und wird nicht im ER bzw. dem Golgi-Apparat, sondern an der Zytoplasmamembran von drei membranständigen Synthasen, den Hyaluronsäuresynthasen 1-3 (HAS1-3), synthetisiert<sup>63</sup>. Um die Hyaluronsäure zu synthetisieren werden UDP-Glukuronsäure und UDP-N-Acetyl-Glukosamin durch die Glykosyltransferase alternierend zu langen Polysaccharidketten verknüpft und unmittelbar von ABC-Transportern durch die Plasmamembran in den Extrazellularraum transportiert<sup>64, 65</sup>.

Die Expression der HA-Synthasen wird durch äußere Umstände wie mechanische Belastung, Scherstress<sup>66</sup> oder Zytokine<sup>67</sup> und Wachstumsfaktoren beeinflusst. Durch verschiedene Arbeitsgruppen konnte nachgewiesen werden, dass die HA-Synthasen zell- und speziesspezifisch exprimiert werden<sup>67</sup>.

Die Hyaluronsäuresynthasen sind unterschiedlich aktiv und extrudieren Hyaluronsäureketten unterschiedlicher Länge und Funktion. Durch *in vitro* Untersuchungen an Fibroblasten konnte nachgewiesen werden, dass die HA-Synthasen HA mit unterschiedlichen Kettenlängen synthetisieren. HAS1

produziert HA mit einem Molekulargewicht von  $2 \times 10^5$  bis  $2 \times 10^6$  Da, HAS2 in einer Größe von  $2 \times 10^6$  Da, während HAS3 Hyaluronsäure mit einem Molekulargewicht von  $1 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Da synthetisiert<sup>68, 69</sup>. Die physiologischen Funktionen der hoch- und niedermolekularen HA sind derzeit nicht vollständig geklärt und werden kontrovers diskutiert. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass hochmolekulare HA die Proliferation und Migration von Zellen durch Ausbildung einer HA-reichen perizellulären Matrix unterstützt<sup>70-73</sup>. Andere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass niedermolekulare HA die Inflammation, Angiogenese, Proliferation und Migration von verschiedenen Zellarten unterstützt<sup>74, 75</sup>. Eine neuere Arbeit an mesenchymalen Zellen zeigt, dass die Zugabe von hochmolekularer HA, die durch die niedermolekulare HA ausgelösten Effekte wieder aufhebt<sup>76</sup>.

### 1.3.2 Hyaluronidasen

Die von den Hyaluronsäuresynthasen produzierten hochmolekularen Hyaluronsäureketten werden durch hyaluronsäureabbauende Enzyme, die Hyaluronidasen (HYAL), in ihrer Kettenlänge bis auf wenige Disaccharideinheiten gespalten<sup>77-79</sup>. Es gibt sechs Isoformen der Hyaluronidase, HYAL1-5 und PH-20. Über HYAL3 ist bisher noch wenig bekannt und ihr konnte noch keine spezifische Funktion zugeschrieben werden. In einer Studie an HYAL3 *knock-out* Mäusen konnte phänotypisch und funktionell kein Unterschied im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen festgestellt werden<sup>80</sup>. HYAL1 und HYAL2 arbeiten in einer Kaskade zusammen, wobei die membranständige HYAL2 mithilfe des CD44 Rezeptors hochmolekulare HA bindet<sup>81, 82</sup> und auf ein 20 kDa großes Fragment spaltet. Diese niedermolekularen Fragmente von etwa 100 Saccharideinheiten<sup>83, 84</sup> werden dann in die Lysosomen transportiert und von der dort lokalisierten HYAL1 bis auf eine Größe von wenigen Disacchariden abgebaut<sup>77</sup>. Pathophysiologische Vorgänge, welche die Synthese der Hyaluronsäure steigern, können durch Zunahme des Substrats für Hyaluronidasen auch zu erhöhtem Abbau führen<sup>77, 85, 86</sup>.

### 1.3.3 Hyaluronsäurerezeptoren und Hyaladhärine

Die HA-Rezeptoren sind ebenso wie die Hyaladhärine in der Lage HA zu binden. Es gibt membranständige Rezeptoren wie CD44 und RHAMM und Bindungspartner ohne Rezeptorfunktion in der EZM, wie zum Beispiel die Proteoglykane.

Der Hyaluronsäurerezeptor CD44 ist ein transmembranäres Glykoprotein, von dem verschiedene Splicevarianten zelltyp- und gewebespezifisch exprimiert werden<sup>87</sup>. Die Interaktion der Hyaluronsäure mit diesem Hyaluronsäurerezeptor spielt bei Entzündungsreaktionen, Entwicklungsprozessen und in der Tumorgenese eine wichtige Rolle<sup>88-90</sup>. Neben der Hyaluronsäure können auch Osteopontin, Matrixmetalloproteinasen und Zytokine an den CD44-Rezeptor<sup>91</sup> binden, wobei die wichtigsten über den CD44-Rezeptor vermittelten Wirkungen durch HA gesteuert werden<sup>92</sup>.

RHAMM (*receptor of hyaluronan mediated motility*) hat eine ungefähre Größe von 70 kDa und ist sowohl im Zellkern, als auch in der Zellmembran sowie im Zytoplasma lokalisiert<sup>93</sup>. RHAMM kommt ebenso wie CD44 in mehreren Splicevarianten vor, deren Expression gewebespezifisch ist<sup>94-96</sup>. Wenn HA an Zelloberflächen assoziiertes RHAMM bindet, werden weitere integrale Membranrezeptoren wie der PDGF-Rezeptor aktiviert. Zusätzlich wird Paxillin, ein Bestandteil des fokalen Adhäsionskomplexes phosphoryliert<sup>97</sup>, wodurch RHAMM die Motilität der Zellen regulieren kann<sup>98</sup>. Dementsprechend führt die Überexpression von RHAMM zu einer verstärkten Zellmotilität<sup>99</sup>.

Die *Toll-like* Rezeptoren (TLR) sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems. TLR 2 und 4 werden jedoch von HA-Oligomeren auf Makrophagen<sup>100</sup>, Endothelzellen<sup>101</sup> und dendritischen Zellen<sup>102</sup> aktiviert. Es wird derzeit angenommen, dass die inflammatorische Wirkung der HA-Fragmente über die TLRs vermittelt wird<sup>100</sup>.

Neben den bisher genannten Hyaluronsäurerezeptoren gibt es in der EZM eine Reihe weiterer HA-bindender Proteine ohne direkte Rezeptorfunktion. Dazu zählen Proteoglykane, TSG-6 und der Inter- $\alpha$ -Inhibitor (I $\alpha$ I)<sup>103-105</sup>. TSG-6 und I $\alpha$ I sind Adaptermoleküle, welche die einzelnen HA-Stränge in der EZM miteinander verknüpfen. Die Proteoglykane, speziell Versikan, interagieren über Bindeproteine mit den Hyaluronsäuresträngen, wodurch es zur Ausbildung der extrazellulären Netzwerke kommt<sup>106</sup>.

### 1.3.4 Funktion der Hyaluronsäure

Die Hyaluronsäure ist ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix und wurde in den 30er Jahren zum ersten Mal aus dem Glaskörper eines Kuhauges isoliert<sup>107</sup>. In besonders großen Mengen kommt HA im Glaskörper des Auges, in der Haut, im



Knorpel, in den Herzklappen und in der Synovialflüssigkeit der Gelenke vor<sup>108, 109</sup>. Eine wichtige Eigenschaft der Hyaluronsäure ist die hohe Wasserbindungskapazität. Die stark negativ geladene HA kann ein 1000-faches ihres eigenen Gewichtes an Wasser binden. Die Hyaluronsäure hat neben ihrem enormen Quellvermögen eine stabilisierende Funktion in verschiedenen Binde- und Stützgeweben. Das Prinzip beruht darauf, dass durch die formgebende Hyaluronsäure das eingelagerte Wasser nicht komprimierbar ist. Als weitere Eigenschaft hat HA Einfluss auf die Zellwanderung. Durch die vermehrte Produktion von HA wird ein Raum im Zellverband eröffnet, in den sich migrierende Zellen hineinbewegen können. Während der Entwicklung spielt die HA eine essentielle Rolle bei der fetalen Gefäßentwicklung. Durch den hohen Gehalt an Hyaluronsäure sind die fetalen Gefäße besonders flexibel und unempfindlich gegenüber mechanischen Belastungen. Zudem spielt auch die Migrations- und Proliferations-unterstützende Rolle der HA während der Entwicklung eine wichtige Rolle<sup>110, 111</sup>.

Ebenso ist die Regulation der HA-Produktion bei pathophysiologischen Gefäßveränderungen von Bedeutung. Bei der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen kommt es zu einer starken Akkumulation der Hyaluronsäure in der extrazellulären Matrix<sup>112</sup>. Die Anreicherung von HA im interstitiellen Raum führt zu einer Volumenexpansion der Plaques und schafft so den Raum für eine beschleunigte Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. Darüber hinaus ist die HA-Akkumulation möglicherweise an der Aufrechterhaltung der Inflammation und der Induktion des Matrixremodelings atherosklerotischer Plaques beteiligt (siehe 1.1.2).

### **1.3.5 Hyaluronsäure assoziierte Erkrankungen**

Neben der Bedeutung der Hyaluronsäure in Entstehung und Exazerbation der Atherosklerose beruhen vermutlich auch weitere Krankheitsbilder auf pathologischen Veränderungen in der Synthese oder dem Abbau der Hyaluronsäure. Eine durch HA-Fragmente verstärkte Inflammation findet sich zum Beispiel bei chronischer Gingivitis oder Paradontitis<sup>113</sup>. Die Erforschung der Hautalterung ist ein weiterer Schwerpunkt in der Hyaluronsäureforschung, wobei speziell die Degeneration und Dehydratation der verschiedenen Hautschichten untersucht wird<sup>114</sup>. Ebenso spielt eine eingeschränkte HA-Produktion eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung entzündlicher Gelenkerkrankungen. Die Synovialflüssigkeit der Gelenke enthält hohe Konzentrationen an Hyaluronsäure, die hier unter anderem als „Gelenkschmiere“

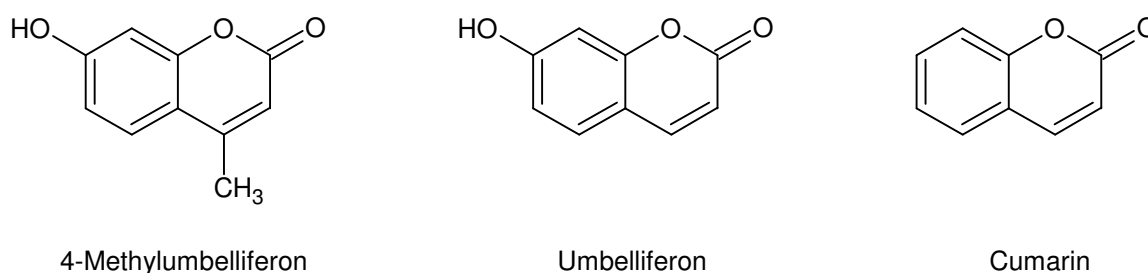
fungiert. Durch die verminderte Produktion kommt es zu einer Osteoarthrose<sup>115</sup> und im weiteren Verlauf zu einer Deformierung der Gelenke mit Bewegungseinschränkungen. Auch hier könnten kleine Hyaluronsäurefragmente proinflammatorisch wirken und eventuell der Auslöser der Arthritis sein<sup>116, 117</sup>.

Hohe HA-Plasmaspiegel sind mit vielen humanen Krebserkrankungen assoziiert. Dabei sind hohe Konzentrationen an Hyaluronsäure im Plasma mit einer schlechten Prognose für die Patienten korreliert<sup>118-121</sup>. Die meisten Tumore sind von einer HA-reichen Matrix umgeben, die außerdem eine hohe Expression des Hyaluronsäurerezeptors CD44 aufweist<sup>122-125</sup>. Die Akkumulation der HA im Tumorgewebe fördert hier die Proliferation, Migration und Angiogenese, zudem kommt es zu einer Abnahme der Apoptose und zu einer Resistenz gegenüber Zytostatika<sup>126-128</sup>. Die gesteigerte Migration und Proliferation durch die vermehrte HA-Synthese erleichtert den Tumorzellen das Durchdringen der Matrix und die Invasion in Fremdgewebe<sup>129, 130</sup>. Darüber hinaus wird das adhäsionsunabhängige Wachstum von Tumorzellen gefördert, der zelleigene Mechanismus der Anoikis kann nicht mehr ausgelöst werden<sup>131, 132</sup>. Durch die Befähigung der Tumorzellen zu adhäsionsunabhängigem Wachstum wird zudem die Tumorabsiedlung in andere Gewebe beschleunigt<sup>135</sup>. Die gesteigerte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika, wird vornehmlich durch die stark diffusionsbehindernden Eigenschaften des perizellulären HA-Mantels erklärt. Zusätzlich trägt auch die stark negativ geladene Oberflächenstruktur der HA zur Entstehung einer Diffusionsbarriere bei und vermindert das Eindringen der Zytostatika in die Tumorzellen<sup>133</sup>.

## 1.4 4-Methylumbelliferon

### 1.4.1 Ursprung, chemische Struktur und klinische Anwendung

Der Hyaluronsäuresynthese-Inhibitor 4-Methylumbelliferon lässt sich anhand seiner chemischen Struktur über hydroxyliertes Umbelliferon auf ein Cumarin-Grundgerüst zurückführen (Abbildung 1-3).



**Abbildung 1-3** Dargestellt sind die Strukturformeln von 4-Methylumbelliferon (links), seiner direkten Vorstufe, Umbelliferon (mitte) und dessen Vorstufe, Cumarin (rechts).

Cumarin ist ein sekundärer Pflanzenstoff der in Waldmeister (*Galium odoratum*), Datteln (*Phoenix dactylifera*), verschiedenen Ruchgräsern (*Anthoxanthum*) und der Tonkabohne (*Dypteryx odorata*) vorkommt. Cumarin wurde 1822 erstmals aus Tonkabohnen isoliert. Nach der synthetischen Herstellung 1886 wurde Cumarin als Aromastoff vermarktet und knapp 100 Jahre später wieder verboten, da in Tierexperimenten toxische Wirkungen festgestellt wurden. Die Cumarin-Derivate Phenprocoumon (Marcumar<sup>®</sup>) und Warfarin (Coumadin<sup>®</sup>) werden aufgrund ihrer antikoagulatorischen Wirkung medizinisch zur Prävention von kardiovaskulären Ereignissen eingesetzt<sup>134</sup>. Zudem dienen diese und andere Cumarin-Derivate als Rodentizide, die bei entsprechend hoher Dosierung bei Ratten zu tödlichen Blutungen führen. In Tierversuchen wurden einzelne Hinweise auf ein kanzerogenes Potential der Cumarine entdeckt<sup>135</sup>. Bei *in vitro* Untersuchungen an humanen Zelllinien konnte jedoch keine krebserregende Wirkung nachgewiesen werden<sup>135</sup>.

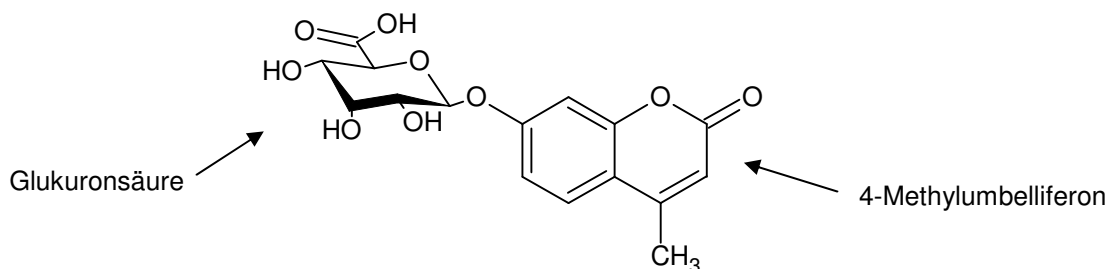
Das an Position sieben hydroxylierte Cumarin wird als Umbelliferon bezeichnet und kommt weltweit in verschiedenen Pflanzenarten vor. Die namesgebende Pflanzenfamilie, die Umbelliferen, sind die Familie mit dem größten Spektrum an Cumarinverbindungen. Neben einfachem Cumarin und Hydroxycumarinen wie dem

Umbelliferon konnte eine Vielzahl von geranylierten oder farnesylierten Cumarinderivaten nachgewiesen werden<sup>136</sup>. Bekannte Vertreter der Umbelliferen sind der Liebstöckel (*Levisticum officinale*) und die Echte Kamille (*Matricaria recutita*).

4-Methylumbelliferon ist ein an der Position vier methyliertes Umbelliferon, welches die IUPAC Bezeichnung 7-Hydroxy-4-methylcumarin trägt und auch unter dem internationalen Freinamen (INN) Hymecromon bekannt ist. 4-MU wird aufgrund seiner papaverinartigen Wirkung als Choleretikum und muskulotropes Spasmolytikum (Cholspasmin<sup>®</sup>, Chol-Spasmoletten<sup>®</sup>) eingesetzt. Die übliche Dosierung beträgt 1200 mg oral *per dies*.

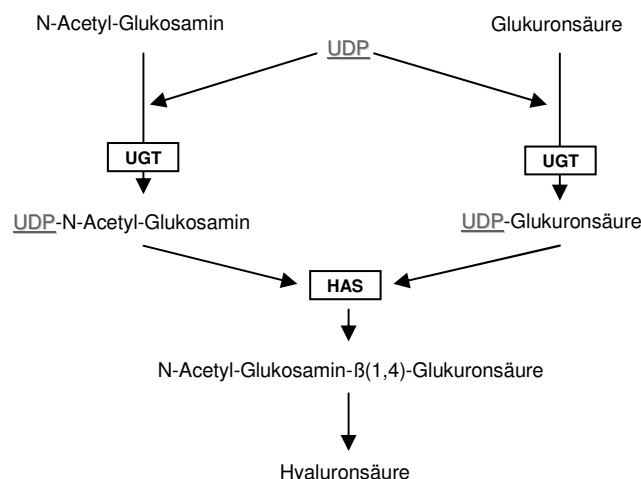
#### 1.4.2 Wirkmechanismus

4-Methylumbelliferon ist ein selektiver Inhibitor der Hyaluronsäuresynthese. Die Hyaluronsäure wird durch die Hyaluronsäuresynthasen 1-3 aus den Vorstufen UDP-N-Acetylglukosamin (UDP-Gluc-NAc) und UDP-Glukuronsäure (UDP-GlucA) synthetisiert. Die Grundbausteine zur Synthese der HA werden durch Übertragung eines UDP-Restes auf N-Acetylglukosamin und die Glukuronsäure durch die UDP-Glukuryltransferase (UGT) bereitgestellt. An Stelle von UDP kann 4-MU über seine Hydroxygruppe an Position vier durch die UGT mit Glukuronsäure kovalent verknüpft werden (Abbildung 1-4). Als Folge sinkt die Konzentration an UDP-Glukuronsäure im Zytosol ab und es kommt zu einer verminderten Hyaluronsäuresynthese<sup>137</sup> (Abbildung 1-5, Abbildung 1-6).

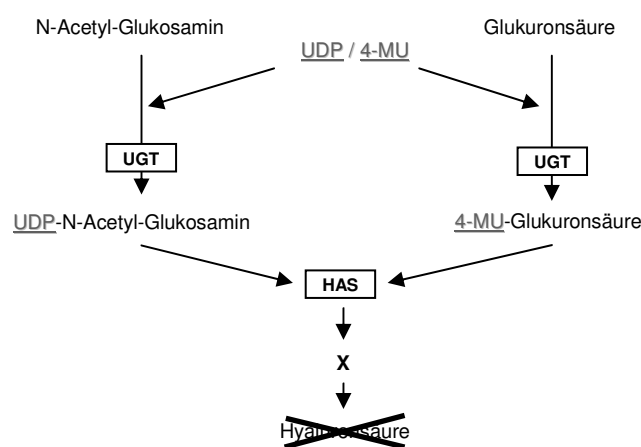


**Abbildung 1-4** Dargestellt ist die Strukturformel von 4-Methylumbelliferon-Glukuronsäure. Infolge dieser Struktur kommt es zu einer Verarmung der UDP-Glukuronsäure im Zytosol, was eine verminderte Hyaluronsäuresynthese zur Folge hat.

Die Studien von Kakizaki *et al.* haben gezeigt, dass die HA-Synthese durch die exogene Zugabe von UDP-Glukuronsäure wiederhergestellt werden kann<sup>137</sup>. Dadurch wurde die kompetitive Substrat-Hemmung durch 4-MU gezeigt. Dieser Mechanismus erklärt, warum 4-MU alle HAS-Isoformen gleichermaßen hemmt.



**Abbildung 1-5** Mechanismus der Hyaluronsäuresynthese aus N-Acetyl-Glukosamin und Glukuronsäure. Die UDP-Glukuryltransferase (UGT) verknüpft Uridindiphosphat (UDP) mit N-Acetyl-Glukosamin und Glukuronsäure. Diese Bausteine werden durch die Hyaluronsäuresynthasen (HAS) zur Hyaluronsäure verknüpft.



**Abbildung 1-6** Mechanismus der Hemmung der Hyaluronsäuresynthese aus N-Acetyl-Glukosamin und Glukuronsäure durch 4-Methylumbelliferon. Die UDP-Glukuryltransferase (UGT) bindet statt UDP 4-MU an die Glukuronsäure. Die Hyaluronsäuresynthasen (HAS) können das UDP-N-Acetyl-Glukosamin nicht mit der 4-MU-Glukuronsäure verknüpfen, als Folge kommt es zu einer Hemmung der Hyaluronsäuresynthese.

### 1.4.3 Bisherige Anwendung von 4-MU in der Forschung

4-Methylumbelliferon wurde 1995 zum ersten Mal eingesetzt um in Hautfibroblasten die HA-Synthese zu hemmen<sup>138</sup>. In dieser Studie wurde eine maximale Hemmung der HA-Synthese bei einer Konzentration von 500 µM 4-MU erreicht. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Synthese hochmolekularer HA durch 4-MU deutlich stärker inhibiert wird als die Synthese niedermolekularer HA. 4-MU inhibiert dabei ausschließlich die Neusynthese von HA ohne die Synthese anderer GAGs wie

Chondroitinsulfat, Dermatansulfat und Keratansulfat zu beeinflussen. Die mechanistische Grundlage für die spezifische Inhibition der HA-Neusynthese ist der unterschiedliche Syntheseort der GAG-Seitenketten und der Hyaluronsäure. Durch einen aktiven Transporter wird spezifisch UDP-Glukuronsäure ins ER oder den Golgi-Apparat transportiert. Dieser aktive Transport führt zu einer Verringerung der zytosolischen UDP-Glukuronsäure-Konzentration, während die Konzentration aktivierter Glukuronsäure in ER und Golgi-Apparat nahezu unverändert bleibt. Durch die starke Anreicherung der 4-MU-Glukuronsäure im Zytosol werden überwiegend die HA-Synthasen in ihrer Funktion gehemmt. Zwei Jahre später wies dieselbe Arbeitsgruppe in einem zellfreien System nach, dass die Inhibition der HA-Synthese direkt am Enzym erfolgt ohne von weiteren Zellbestandteilen abhängig zu sein<sup>139</sup>. Von einer anderen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass 4-MU zu einer Erhöhung der Genexpression der Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP)-1 und MMP-2 führt. Die veränderte MMP-Expression kann mit der veränderten Zusammensetzung der EZM durch die verringerte HA-Synthese erklärt werden und wird vermutlich nicht durch eine direkte Wirkung von 4-MU auf die MMP-Expression vermittelt<sup>140</sup>. Studien zeigten, dass 4-MU die Anheftung und Bewegung von bestimmten Tumorzellen verringert<sup>141</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass es zu einer Senkung der epidermalen Hyperproliferation kommt, ausgelöst durch die Eindämmung der Keratinozyten-Aktivierung<sup>142</sup>. Die ersten *in vivo* Studien an Mäusen zur Untersuchung welchen Einfluss 4-MU auf Lebermetastasen hat, wurden im Jahr 2005 durchgeführt<sup>143</sup>. Es zeigte sich eine Reduktion der Lebermetastasen um 30 % in den 4-MU behandelten Mäusen. Im Jahr 2006 zeigten Forscher, dass die HAS3-vermittelte Proliferation und Invasion von Osteosarkoma-Zellen durch 4-MU maßgeblich gehemmt wurde<sup>144</sup>. 2007 konnte die starke Senkung der Tumorphiliferation durch Einfluss von 4-Methylesculetin in immundefizienten Nacktmäusen nachgewiesen werden<sup>145</sup>. Im Jahr 2007 konnte des Weiteren gezeigt werden, dass 4-MU die MMP-9 Expression in Krebszellen senkt<sup>146</sup>. Erst im Jahr 2004 wurde der genaue Wirkmechanismus (siehe 1.4.2) von Kakizaki *et al.* entdeckt<sup>137</sup>. Seither wird 4-MU als Inhibitor der Hyaluronsäure-synthese immer häufiger eingesetzt.

## 1.5 Zielsetzung

Die Atherosklerose und ihre Komplikationen sind die häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen und stehen seit mehreren Jahrzehnten im Mittelpunkt der medizinischen und biochemischen Forschung. Der initiale Schritt in der Entstehung dieser chronischen Entzündung der Gefäßwand ist eine endotheliale Dysfunktion. Durch die vermehrte Freisetzung von Entzündungsmediatoren infolge der endothelialen Dysfunktion wird die Transformation der glatten Muskelzellen der Media von einem kontraktile und ruhenden zu einem sekretorischen Phänotyp induziert. Der sekretorische Phänotyp führt zu einer gesteigerten Proliferation und Migration, sowie zu einer verstärkten Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Bestandteilen der extrazellulären Matrix. Ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix von atherosklerotischen Läsionen ist die Hyaluronsäure. Die Hyaluronsäure fördert die Migration und Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen in der Neointima der atherosklerotischen Plaques. Daher wird davon ausgegangen, dass die HA-Akkumulation die Neointima-Expansion unterstützt und somit die Progression der Atherosklerose fördert. Im Umkehrschluss könnte die pharmakologische Inhibition der HA-Synthese die Atherosklerose hemmen. Diese Arbeitshypothese ist Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen.

Im Detail wurden in dieser Arbeit folgende Parameter untersucht:

- Welchen Einfluss hat die pharmakologische Inhibition der HA-Synthese mit 4-Methylumbelliferon auf das kardiovaskuläre System von Mäusen?
- Welche Auswirkungen haben diese Veränderungen auf die Progression der Atherosklerose?
- Welche Mechanismen liegen diesen Veränderungen zugrunde?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Puffer und Lösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in höchster verfügbarer Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

**Tabelle 2-1** Verwendete Puffer und Lösungen

<b>Puffer bzw. Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
ABC-Puffer	0,60 g Tris 1,33 g Natriumacetat x 3 H <sub>2</sub> O 0,30 g NaCl <i>ad</i> 100 ml <i>Aqua dest.</i> BSA 1 mg/ml pH 8,0
Antikoagulans	100 mM EDTA 0,9 % NaCl pH 7,0
Blockierlösung für Histologie	1 mg/ml BSA in PBS
Blockierlösung endogener Peroxidasen	0,7 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in MeOH
4% Formalin nach Lillie	46 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 29 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 4 % Formalin
Glykokalyx Fixierlösung	3,6 % Glutaraldehyd in <i>Aqua dest.</i> 0,5 M Cacodylatpuffer 0,3 % Rutheniumrot
Glykokalyx Nachfixierung	4 % Osmiumtetroxid in <i>Aqua dest.</i> 0,5 M Cacodylat-Puffer 0,3 % Rutheniumrot
Glykokalyx Waschlösung	0,1 M Cacodylatpuffer
Krebs-Henseleit-Puffer (modifiziert)	145,85 mM Natrium 127,14 mM Chlorid 5,87 mM Kalium



	25,00 mM Hydrogencarbonat 1,60 mM Calcium 1,18 mM Dihydrogenphosphat 1,18 mM Magnesium 1,18 mM Sulfat 5,50 mM Glucose
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 8,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7,4
4 % Paraformaldehyd	PBS 4 % Paraformaldehyd pH 7,4
Rekalzifizierungspuffer	20 mM HEPES 60 mg/ml BSA 100 mM Calcium pH 7,35
Saccharose-Lösung	1 x PBS 20 % Saccharose pH 7,4
sterile NaCl-Lösung	0,9 % steriles NaCl
Tris Puffer	6,07 g Tris <i>ad 1 l Aqua dest.</i> pH 7,6

## 2.2 Farbstoffe und Färbelösungen

**Tabelle 2-2** Verwendete Farbstoffe und Färbelösungen

Farbstoff	Färbelösung
Coelestinblau	4,4 % (w/v) $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 0,4 % (w/v) Coelestinblau 12,3 % (v/v) Glycerin
Hämalaun nach Mayer	gebrauchsfertig von Merck (Darmstadt, Deutschland)

<i>Oil-red-O</i>	10 ml NaOH (1 M) 35 ml <i>Oil-red-O</i> Lösung (0,5%-ig in MeOH)
Picro-Siriusrot	0,1 % (w/v) Picro-Siriusrot gesättigte Pikrinsäurelösung

## 2.3 Substanzen und Komplettpakete

**Tabelle 2-3** Verwendete Substanzen und Komplettpakete

<b>Substanzen</b>	<b>Hersteller</b>
Acetylcholin	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Aquatex	Merck, Darmstadt, Deutschland
Carbogen	Linde Gas Therapeutics, Unterschleißheim, Deutschland
Chondroitinase ABC	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Coelestinblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Convulxin	Alexis, Lörrach, Deutschland
Diaminobenzidin	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Entellan <sup>®</sup>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Epon <sup>®</sup>	Polysciences, Eppelheim, Deutschland
Hoechst 33324	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
<i>Hyaluronic Acid Test Kit</i>	Corgenix, Colorado, USA
Hyaluronidase ( <i>Streptomyces hyalurolyticus</i> )	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Innovin	Dade Behring, Marburg, Deutschland
Kieselgel	Merck, Darmstadt, Deutschland
4-Methylumbelliferon	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcacodylat	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Oil-red-O</i>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Pikrinsäure, gesättigt	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Prolong gold	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Rose Bengal	Acros Organics, Geel, Belgien
Rutheniumrot	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Sirius Rot/Direct red 80	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
<i>SuperScript™ III First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>SYBR Green® PCR Master Mix</i>	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TissueTek-Einbettmedium	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
TriReagent®	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Vectashield® <i>Mounting Medium</i>	Vector Laboratories, CA, USA

## 2.4 Antikörper

**Tabelle 2-4** In der Immunhistochemie verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung
α-SM-Aktin, polyklonal	Abcam, Cambridge, UK	1:50
Biglykan LF106, polyklonal	von Larry Fisher (NIH, USA) zur Verfügung gestellt	1:1000
FITC-konjugierte Isotypkontrolle, <i>mouse</i> IgG-FITC	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland	1:200
PE-konjugierte Isotypkontrolle, <i>mouse</i> IgG-PE	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland	1:200
anti-CD62P, FITC-konjugiert, <i>rat-anti-mouse</i>	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	1:100
CD41, FITC-konjugiert, <i>rat-anti-mouse</i>	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	1:100
Decorin LF113, polyklonal	von Larry Fisher (NIH, USA) zur Verfügung gestellt	1:1000
COX-2 polyklonal	Cayman, Ann Arbor, USA	1:300
Hyaluronsäurebindeprotein, biotinyliert	Seikagaku, Tokyo, Japan	2 µg/ml
RHAMM R36	von Rashmin Savani (Southwestern, USA) zur Verfügung gestellt	1:200
Mac 2, polyklonal, <i>rat-anti-mouse</i>	CEDARLANE Laboratories, Burlington, Canada	1:400

**Tabelle 2-5** In der Immunhistochemie verwendete Sekundärantikörper

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
<i>goat-anti-rabbit</i> IgG, HRP konjugiert	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:400
<i>goat-anti-rabbit</i> IgG F(ab') <sub>2</sub> Frag. Cy3-konjugiert	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland	1:600
<i>goat-anti-rat</i> IgG, Rhod-red X konjugiert, präadsorbiert,	Dianova, Hamburg, Deutschland	1:400
<i>sheep-anti-rabbit</i> Cy3	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland	1:200
Streptavidin Typ IV, HRP konjugiert, (S-5512)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland	250 ng/ml

## 2.5 Primer Real Time

**Tabelle 2-6** Für die RTq-PCR verwendete Primer

<b>Gen</b>	<b>Primer-Sequenz</b>
GAPDH	5'-TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC-3' 5'-AAGATGGTGATGGGCTTCCCG-3'
HAS1	5'-CTATGCTACCAAGTATACCTCG-3' 5'-TCTCGGAAGTAAGATTTGGAC-3'
HAS2	5'-CGGTCGTCTCAAATTCATCTG-3' 5'-ACAATGCATCTTGTTTCAGCTC-3'
HAS3	5'-GATGTCCAAATCCTCAACAAG-3' 5'-CCCACTAATACATTGCACAC-3'
HYAL1	5'-AAGTACCAAGGAATCATGCC-3' 5'-CTCAGGATAACTTGGATGGC-3'
HYAL2	5'-GGTGGACCTTATCTCTACCAT-3' 5'-TATTGGCAGGTCTCCATACTT-3'
CD44	5'-GACCGGTTACCATAACTATTGTC-3' 5'-CATCGATGTCTTCTTGGTGTG -3'

## 2.6 Arzneistoffe

**Tabelle 2-7** Verwendete Arzneistoffe

Wirkstoff	Arzneimittel-Name	Hersteller
Buprenorphin	Temgesic <sup>®</sup> Amp.	Essex Pharma, München, Deutschland
Esketamin	Ketanest <sup>®</sup> S 25 mg/ml	Pfizer, Karlsruhe, Deutschland
Phenylephrin	Phenylephrin > 98%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Xylazin-HCl	Rompun <sup>®</sup> 2 %-ige Inj. Lösung <i>ad us vet.</i>	Bayer, Leverkusen, Deutschland

## 2.7 Material, Geräte und Software

**Tabelle 2-8** Verwendetes Material, Geräte und Software

Material, Geräte und Software	Bezeichnung	Hersteller
Autotechnikon	Shanon Citadel 1000	Shanon, Frankfurt, Deutschland
Blutdruckmessung	BP-2000 Blood Pressure Analysis System	Visitech Systems, Apex, USA
Blutdruckmessung Software	Blood pressure analysis	Visitech Systems, Apex, USA
Doppler-Sonde	Transonic Flowprobe	Transonic Systems Inc. New York, USA
ELISA-Microplate-Reader	Microplate Reader Model 550	Bio-Rad, München, Deutschland
Objektträgerbox	Objektträgerkasten 100	Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, Deutschland
EM Kamera	MegaView II slow-scan-CCD	Soft Imaging System, Münster, Deutschland
EM Software	ITEM 5.0 software	Soft Imaging System, Münster, Deutschland
FACS Software	CXP Analysis Software 2.2	Canimpex Enterprises,

		CA, USA
Flussmessung Laser	25-LGR-193-230	Melles Griot, Bensheim, Deutschland
Flussmessung Software	Chart 5 for Windows v5.5.1	ADInstruments, Spechbach, Deutschland
Gelkissen	ColdHot Classic	3M Health Care, Borken, Deutschland
GraphPad Prism-Software	GraphPad Version 4.00	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageJ Software	ImageJ 1.37v Software	NIH, USA
Kaltlichtquelle	Schott KL 1500 <sub>LCD</sub>	Schott, Mainz, Deutschland
Kamera	Power Shot G6	Canon Inc., Tokio, Japan
Kryokästen	Objektträgerkasten eco 100	Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, Deutschland
Kryostat	Leica CM 1850	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Kühlplatte	Leica EG 1150c	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikro-Knüpfpinzette	Mikro-Knüpfpinzette gebogen, Maul 0,3 mm	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Mikroskop	Olympus BX 50	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikroskop BX 50 Kamera	Colorview II Kamera	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikroskop BX 50 Software	Soft Imaging System- Software	Soft Imaging System, Münster, Deutschland
Nahtmaterial	Perma-Hand Seide 6-0 G1	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Mikroskop DM-2000 Software	Leica Analysis Software	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Objektträger (Paraffin)	SuperFrost Plus	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland

Objektträger (Kryo)	Histobond	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Opticon 1 Platte	MJ-Research	Waltham, MA, USA
Paraffin-Einbettstation	TES 99	Medite, Nunningen, Schweiz
Paraffinstreckbad	Medax 25900	Medax, Kiel, Deutschland
Photoshop Software	Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems, San Jose, USA
RNA-Messung	Nanodrop-1000	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Rotationsmikrotom	Leica RM 2255	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
RT-qPCR	Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Schreiber Organbad	SE-120	ABB, Mannheim, Deutschland
Stereomikroskop	Stemi 2000	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Thrombinoscope	Fluoroskan Ascent	Thermo Electron Corporation, Cheshire, UK
Thrombinoscope Software	Thrombinoscope Analysis Software 3.0	Thermo Electron Corporation, Cheshire, UK
Transelektronenmikroskop	EM 902A	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Umwälzthermostat-Wasserbad	NB 22	Haake, Karlsruhe, Deutschland
Verstärker-Schreiber	SE-120	ABB, Mannheim, Deutschland
Wundklammern	Wundklammern n. Michel 7,5 x 1,75 mm	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R (kühlbar)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zytometer	Cyomics FC 500	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

## 2.8 Tiere und Futtermischungen

### 2.8.1 Tiere

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen fanden an Mäusen statt, bei denen das Gen für das Apolipoprotein E (ApoE) nicht mehr funktionsfähig ist. Diese sogenannten homozygoten *knock-out* Tiere haben einen genetisch gemischten C57BL/6x129 Hintergrund. Durch den Defekt im Apolipoprotein E haben die Mäuse erhöhte Cholesterin-Plasmaspiegel und entwickeln spontan eine starke Atherosklerose<sup>147</sup>. Die ApoE-defizienten Tiere wurden von der Firma Taconic M&B (Lille Skensved, Dänemark) bezogen und in den Tierversuchsanstalten der Universitätsklinik Düsseldorf und Essen gezüchtet. Die Tiere wurden unter konstanten klimatischen Bedingungen in einem 12 Stunden Tag- und Nachtrhythmus gehalten. Futter und Wasser standen den Tieren immer *ad libitum* zur Verfügung. Für alle Versuche wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet.

### 2.8.2 Futtermischungen

Die Versuchstiere erhielten spezielle Futtermischungen in denen die Prüfsubstanz 4-Methylumbelliferon verpresst wurde (Ssniff, Soest, Deutschland). Alle Tiere erhielten von Geburt an ssniff<sup>®</sup>NM, ein Alleinfuttermittel für die Zucht und Haltung von Nacktmäusen (Ssniff, Soest, Deutschland). Dem Studiendesign der jeweiligen Versuchsgruppe entsprechend wurden die Tiere ab einem Alter von vier oder zehn Wochen für unterschiedlich lange Zeiträume, von vier bis einundzwanzig Wochen, mit dem 4-MU enthaltenden Spezialfutter (4-MU) oder dem Kontrollfutter (WD) gefüttert (siehe 2.9). Das 4-MU wurde in eine so genannte Western-Diät (ssniff S8200-E015) verpresst. Western-Diät ist eine cholesterin- und fettreiche Diät, bestehend aus 21 % Butterfett und 0,15 % Cholesterin, womit die Entwicklung der Atherosklerose in diesem Mausmodell beschleunigt wird. Das 4-Methylumbelliferon wurde mit der Western-Diät in einer Konzentration von 50 g pro 1 kg Western-Diät (ssniff S8200-P145) vermischt, was einer Dosierung von 250 mg/Maus\*d entsprach. Das Futter wurde bis zur Fütterung bei 4 °C in verschließbaren Boxen gelagert.

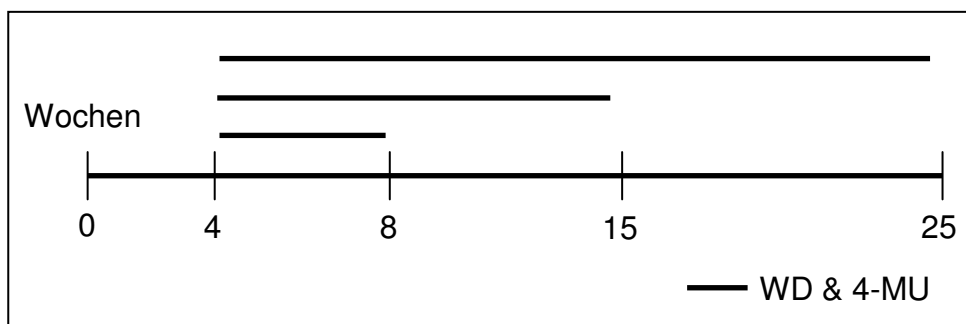


## 2.9 Studiendesign

Das Design dieser Studie zur Analyse des Effekts von 4-MU auf die (i) Entstehung und Progression der Atherosklerose, sowie auf die (ii) Progression präexistenter atherosklerotischer Läsionen sollte sowohl durch die unterschiedliche Behandlungsdauer als auch durch Beginn der Behandlung in unterschiedlichen Stadien der Atheroskleroseentwicklung ermöglicht werden.

### 2.9.1 Studie zur Kurz-, Intermediär- und Langzeitbehandlung mit 4-MU auf die Atherosklerose

Weibliche ApoE-defiziente Mäuse wurden bis zur vierten Lebenswoche mit ssniff<sup>®</sup>NM (Ssniff, Soest, Deutschland) gefüttert. Beginnend im Alter von 4 Wochen erhielten die Versuchstiere Spezialfutter mit 10 mg/g\*d 4-MU (ssniff S8200-P145, WD & 4-MU) für einen Zeitraum von vier, elf und 21 Wochen. Die Kontrolltiere erhielten für die genannten Zeiträume nur Western-Diät ohne Prüfsubstanz (ssniff S8200-E015, WD).

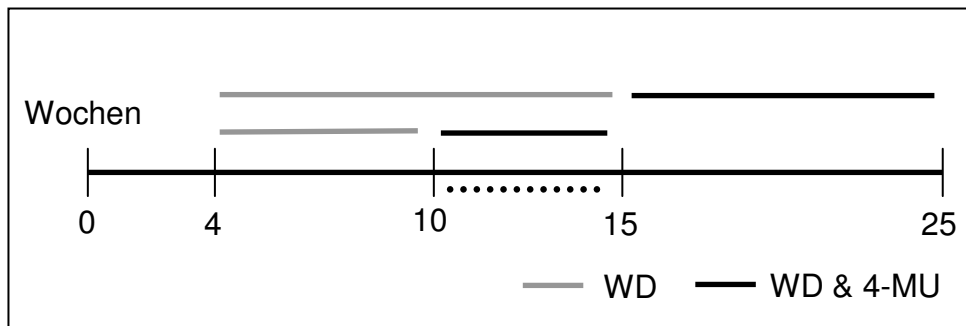


**Abbildung 2-1** Zeitplan für die Untersuchung der Kurz-, Intermediär- und Langzeitbehandlung auf die Atherosklerose mit 4-Methylumbelliferon.

### 2.9.2 Studie zur Behandlung mit 4-MU auf präexistente Atherosklerose

Aus einem noch nicht veröffentlichten Zeitgang von ApoE-defizienten Mäusen auf Western-Diät (ssniff S8200-E015) ist bekannt, dass der Höhepunkt der Makrophagen-Akkumulation zwischen der 10. und 14. Lebenswoche erreicht wird, wenn die Fütterung mit Western-Diät bei vier Wochen alten Tieren beginnt. Um diesen Gipfel der Inflammation genauer zu untersuchen, wurden die Tiere in der ersten Versuchsgruppe von der vierten Lebenswoche an mit Western-Diät (ssniff S8200-E015) gefüttert und ab der zehnten Lebenswoche erhielten die Tiere

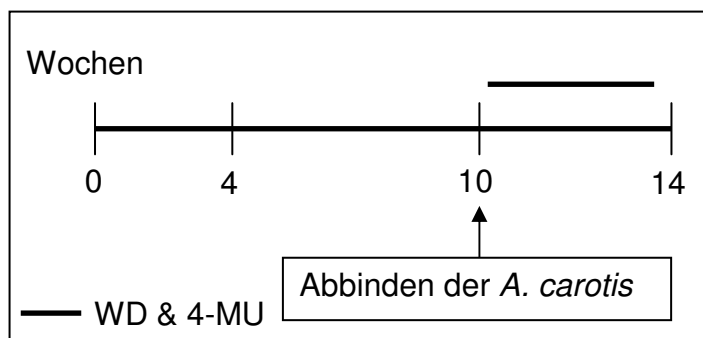
Western-Diät und 10 mg/g\*d 4-Methylumbelliferon (ssniff S8200-P145) für fünf Wochen. Mit einem Endalter von 15 Wochen wurden diese Tiere getötet und weiteren Untersuchungen zugeführt. In der zweiten Versuchsgruppe wurden die Tiere erst mit 15 Wochen, also nach dem Höhepunkt der Inflammation für zehn Wochen mit 4-MU behandelt. Vor der 15. Woche erhielten die Tiere Western-Diät ohne Zusatz der Prüfsubstanz (WD).



**Abbildung 2-2** Zeitplan für die Behandlung präexistenter Atherosklerose mit 4-Methylumbelliferon zu verschiedenen Zeitpunkten. Die gepunktete Linie markiert den Zeitraum der maximalen Makrophagen-Akkumulation.

### 2.9.3 Einfluss von 4-MU im Modell der Neointimahyperplasie

Zur Erzeugung einer Neointimahyperplasie wurde die linke *Arteria carotis communis*, wie von Kumar *et al.* beschrieben<sup>148</sup>, dauerhaft abgebunden. Bis zu einem Alter von zehn Wochen erhielten alle Mäuse das ssniff<sup>®</sup>NM Nacktmausfutter. In der 10. Woche erfolgte die Ligatur unter Narkose mit Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg). Postoperativ wurden die Tiere entweder mit Western-Diät (ssniff S8200-E015) oder 4-MU haltiger Western-Diät (10 mg/g\*d; ssniff S8200-P145) für einen Zeitraum von vier Wochen gefüttert. Vier Wochen nach Abbinden der *Arteria carotis communis*, also mit einem Lebensalter von 14 Wochen wurden die Mäuse getötet und die Organe entnommen.



**Abbildung 2-3**

Experimentelles Design für die Erzeugung einer Neointimahyperplasie unter Einfluss von 4-MU durch Abbindung der *A. carotis sinister*.

## 2.10 Probenentnahme für biochemische, histologische und molekularbiologische Analysen

### 2.10.1 Plasmapräparation

Unter Narkose mit Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg) oder nach Tötung mit CO<sub>2</sub> wurde Blut mittels Herzpunktion entnommen. Die dafür benutzten Spritzen enthielten 100 µl 100 mM EDTA als Antikoagulans in 0,9 % NaCl. Die Gewinnung des Blutplasmas wurde wie von Sommeijer *et al.* beschrieben durchgeführt<sup>149</sup>. Die Plasmaproben wurden bis zur weiteren Analyse bei –20 °C gelagert.

### 2.10.2 Organentnahme für histologische Analysen

Für die Organentnahme wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> getötet. Nach Desinfektion des Brustkorbes wurde dieser geöffnet, das Zwerchfell von den Rippenbögen gelöst und die Rippen seitlich aufgeschnitten und entfernt. Das freigelegte Herz wurde am Beginn des Aortenbogens abgetrennt und entnommen, ebenso wie die vom Aortenbogen ausgehende linke und rechte *Arteria carotis communis*.

Für histologische *en face* Untersuchungen des Plaquebesatzes der Aorta wurde die Maus mit einer Kombination aus Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg) durch *i.p.* Injektion betäubt. Anschließend wurde der Brustkorb geöffnet und die Maus zur Fixierung der Plaques der Aorta durch den linken Ventrikel mit 10 ml 4 % PFA perfundiert. Zum Druckausgleich während der Perfusion wurde die *Arteria femoralis dextra* und *Arteria femoralis sinister* geöffnet.

### 2.10.3 Entnahme der Aorta für molekularbiologische Untersuchungen

Für die Präparation der Aorta zur Gewinnung von RNA, wurde steriles und RNase-freies Operationsbesteck verwendet. Die Mäuse wurden mit CO<sub>2</sub> getötet, anschließend wurde der Brustkorb desinfiziert und geöffnet. Nach dem Entfernen der Organe wurde die Aorta *in situ* grob von der anhaftenden Adventitia befreit. Die Aorta wurde am Aortenbogen vom Herz abgetrennt und bis zur Gabelung der *Arteria femoralis* von der Wirbelsäule und den Nierenabgängen gelöst. Die Aorta wurde in gekühltes PBS überführt, von der restlichen Adventitia befreit und bei –80 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Die gesamte Präparationsdauer lag in allen Fällen

unter sieben Minuten, da in Vorversuchen festgestellt wurde, dass bereits nach acht Minuten eine Degradation der RNA durch RNasen einsetzt.

## **2.11 Einbettung und Aufarbeitung des Probenmaterials**

### **2.11.1 Paraffin-Einbettung und Aufarbeitung**

Um aus der entnommenen *A. carotis communis* Paraffinschnitte anzufertigen, wurden diese für sechs Stunden bei RT in Lillie-Puffer fixiert und anschließend in PBS überführt, wo sie bei 4°C bis zu ihrem Absinken in der Lösung gelagert wurde. Die entnommenen *A. carotis* wurden maschinell in einem Autotechnikon (Shandon Citadel 1000, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) mittels aufsteigender Alkoholreihe und Xylol entwässert und anschließend in flüssiges Paraffin überführt. Die Proben wurden manuell an einer Paraffin-Einbettstation (TES 99, Medite, Nunningen, Schweiz) in Paraffin eingebettet und auf der dazugehörigen Kühlplatte (Leica EG 1150c, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) abgekühlt. An einem Rotationsmikrotom (Leica RM 2255, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) wurden Gewebeschnitte in 5 µm Dicke von der *Arteria carotis communis* über die Länge des gesamten Gefäßes angefertigt und in ein Paraffin-Streckbad (Medax, Kiel, Deutschland) überführt. Ausgehend vom Ligaturknoten wurden fünf Schnitte pro Objektträger (Histobond, Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) über die gesamte Länge der entnommenen *A. carotis* angefertigt. Nach den ersten 250 µm, ausgehend vom Ligaturknoten, wurden nur noch alle 50 µm je fünf Schnitte auf die Objektträger aufgezogen. Um ein späteres Ablösen der Schnitte während der Färbungen zu verhindern, wurden die Schnitte in einem Trockenschrank für eine Stunde bei 60°C hitzefixiert und anschließend bis zur weiteren Bearbeitung in Objektträgerboxen (Objektträgerkasten 100, Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, Deutschland) gelagert.

### **2.11.2 Kryo-Einbettung und Aufarbeitung**

Um Gefrierschnitte des Aortenursprungs anzufertigen, wurde das Gewebe für vier Stunden in 4 % PFA bei RT fixiert. Anschließend wurde das Gewebe zur Kryoprotektion in Saccharose-Lösung überführt und dort einige Tage bei 4°C gelagert. Die Gewebeproben wurden in TissueTek-Einbettmedium (Leica

Microsystems, Wetzlar, Deutschland) eingebettet und bei -40°C in Isopentan eingefroren. Die eingebetteten Gewebeproben wurden bis zur Anfertigung der Schnitte bei -80°C gelagert. An einem Kryostaten (Leica CM 1850, Leica Microsystems, Wetzlar) wurden bei einer konstanten Temperatur von -20°C 14 µm Gewebeschnitte des Aortenursprungs angefertigt. Die angefertigten Schnitte wurden in Kryoboxen (Objektrträgerkasten eco 100, Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, Deutschland) mit einem Päckchen Kieselgel zum Schutz vor eventuell auftretender Feuchtigkeit bei -20°C gelagert.

## **2.12    *En face* Färbung der Aorta**

Um den Plaquebesatz der Aorta histologisch darzustellen wurde eine Lipidfärbung mit dem Farbstoff *Oil-red-O* (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) durchgeführt. Durch den Farbstoff wurden Triglyzeride und Lipide im Gewebe rot angefärbt. Die in 4 % PFA fixierten Aorten wurden fünf Minuten in 78 % MeOH gewaschen um PFA-Reste zu entfernen. Anschließend wurden die Aorten für 90 Minuten in der *Oil-red-O* Färbelösung inkubiert und nachfolgend fünf Minuten in 78 % MeOH gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die gefärbten Aorten wurden in PBS bei 4°C bis zur Dokumentation gelagert.

## **2.13    Histologische Färbungen**

### **2.13.1    Hämatoxylin und Eosin (H&E)**

Die Paraffinschnitte der *A. carotis* wurden einer H&E-Färbung unterzogen. Hämalan, welches mit seinen positiven Ladungen basisch ist, lagert sich über elektropolare Bindungen an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA des Zellkerns an. Durch die Zugabe von Salzsäure wird es sauer, was zu einem Farbumschlag von braun nach blau führt. Das anschließende Bläuen unter Leitungswasser hebt den pH-Wert und fixiert damit die Bindung. Eosin, als synthetischer saurer Farbstoff, färbt alle azidophilen und eosinophilen Strukturen wie Zellplasmaproteine rot. Nach Entparaffinieren in Xylol, wurden die Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe bis 70 % Ethanol geführt und nachfolgend in *Aqua dest.* gewaschen. Anschließend erfolgte die Kernfärbung mit Hämalan, Differenzierung in HCl und Bläuen unter fließendem Leitungswasser. Die Schnitte

wurden in 1 %-ige wässrige Eosin-Lösung überführt, einer anschließenden aufsteigenden Alkoholreihe mit Xylol unterzogen und zur Aufbewahrung und Dokumentation mit Entellan® (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

### **2.13.2 Kollagen**

Um Kollagen in den Plaques des Aortenursprungs anzufärben, wurde Picro-Siriusrot (Fluka Chemie, Buchs, Schweiz), wie von Puchtler *et al.* beschrieben<sup>150</sup>, verwendet. Nach dem Fixieren der Gefrierschnitte in absolutem Ethanol wurden die Schnitte sieben Minuten mit Coelestinblau (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gefärbt, um die Zellkerne sichtbar zu machen und anschließend zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Im Anschluss wurden die Schnitte 15 min mit Picro-Siriusrot gefärbt und mit Entellan® eingedeckt, nachdem sie eine aufsteigende Alkoholreihen mit anschließendem Xylolbad durchlaufen hatten. Mit der Picro-Siriusrot Färbung wird neben dem Kollagen selbst auch die Dichte der Faseranordnung in polarisiertem Licht sichtbar gemacht. Die dichter angeordneten Fasern erscheinen im polarisierten Licht rot und die weniger dicht gepackten Kollagenfasern stellen sich grün dar.

## **2.14 Immunhistologische Färbungen**

Die Objektträger mit den darauf enthaltenen Schnitten wurden je nach untersuchtem Antigen bei 4°C für zehn bis 60 Minuten in der jeweiligen Lösung fixiert (siehe Tabelle 2-9), um ein Abschwimmen der Schnitte während der Färbung zu verhindern. Die Fixierlösung wurde mit PBS abgewaschen. Bei der Färbung auf Biglykan und Decorin wurde nach dem Fixieren ein Verdau der Chondroitinsulfatketten mittels Chondroitinase ABC für 60 min bei 37°C durchgeführt, um das Antigen für den Primärantikörper zugänglich zu machen. Dem Verdau schloss sich sofort die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen an. Die Schnitte für die anderen Antigenfärbungen wurden sofort nach dem Abwaschen der Fixierlösung für 60 min in eine BSA-haltige Blockierlösung bei Raumtemperatur (RT) überführt. Nach dieser einstündigen Behandlung wurden die dem Antigen entsprechenden Primärantikörper aufgetragen (siehe Tabelle 2-4) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der überschüssige Primärantikörper entfernt. Für die Antigendetektion mittels DAB-Färbung wurden zunächst die endogenen Peroxidasen für 20 Minuten bei RT mit Peroxidaseblock behandelt. Dieser musste vor Aufbringung des Zweitantikörpers

ausgewaschen werden. Nach einstündiger Inkubation mit den Zweitantikörpern wurde mittels einer Meerrettich-Peroxidase katalysierten Umsetzung von DAB das Antigen lokalisiert. Das Auftragen des jeweiligen fluoreszierenden Sekundärantikörpers (siehe Tabelle 2-5) erfolgte bei RT für 60 min direkt nach dem Abwaschen des Primärantikörpers unter Lichtausschluss. Die Kerndetektion und Einbettung fand wie in Tabelle 2-9 beschrieben für das jeweilige Antigen statt.

**Tabelle 2-9** Antigene der immunhistologischen Färbung mit Auflistung der jeweiligen Fixierung, Kerndetektion und Einbettung

<b>Antigen</b>	<b>Fixierung</b>	<b>Detektion</b>	<b>Kerndetektion</b>	<b>Einbettung</b>
Apha-SM-Aktin	Aceton/Methanol 2:3, 10 min	Fluoreszenz	Hoechst 33342	Vectashield
Biglykan	Formalin, 60 min	DAB	Hämalaun	Aquatex
Decorin	Formalin, 60 min	DAB	Hämalaun	Aquatex
COX-2	abs. EtOH, 30 min	Fluoreszenz	Prolong Gold	Vectashield
HA	abs. EtOH, 30 min	DAB	Hämalaun	Aquatex
Mac2	abs. EtOH, 30 min	Fluoreszenz	Prolong Gold	Vectashield
RHAMM	abs. EtOH, 30 min	Fluoreszenz	Prolong Gold	Vectashield

## 2.15 Aufnahme und Auswertung der Färbungen

### 2.15.1 Aufnahme der histologischen und immunhistologischen Färbungen

Die histologischen und immunhistologischen Aufnahmen wurden mit einem Mikroskop der Firma Olympus (Olympus BX50, Olympus, Hamburg, Deutschland) mit aufgesetzter Kamera (Corlorview II mit SoftImaging System-Software, Soft Imaging System, Münster, Deutschland) und einem Leica DM-2000 Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) angefertigt.

Um die Packungsdichte der Kollagenfasern in den Siriusrot gefärbten Plaques des Aortenursprungs darzustellen, wurde ein Polarisationsfilter (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) in den Lichtkanal des Mikroskops geschoben und ein Analysator auf die Lichtquelle gelegt.

Die Fluoreszenzaufnahmen der Präparate wurden im Dunkeln aufgenommen. Als für die Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Chromophore dienten Hoechst 33324 mit einem Absorptionsmaximum von 343 nm und Cy3 mit einem Absorptionsmaximum von 550 nm. Für die Fluoreszenzaufnahmen wurden den Chromophoren entsprechende Filter des Mikroskops verwendet. Die Überlagerung der Kanäle erfolgte über eine negative Multiplikation der Ebenen mittels der Soft Imaging System-Software (SIS, Münster, Deutschland). Danach wurden die Ebenen gemeinsam im TIF-Format abgespeichert, die Auswertung erfolgte an dem so entstandenen Bild.

### **2.15.2 Aufnahme der Aorta**

Die aufgeschnittene Aorta wurde mit einem Stereomikroskop der Firma Zeiss (Stemi 2000C, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und einer Kamera der Firma Canon (Canon Power Shot G6, Canon inc., Tokio, Japan) als JPEG-Datei in einer 8-fachen Vergrößerung photographiert.

### **2.15.3 Morphometrische und quantitative Auswertung der Färbungen**

Um die histologischen und immunhistochemischen Färbungen quantitativ auszuwerten wurde die Software ImageJ 1.37v (NIH, USA) verwendet. Das verwendete *PlugIn Colour Deconvolution* trennt die Farbkanäle für die Kernfärbung von den jeweilig anderen Farbkanälen. So konnte das Farbsignal der Zielstruktur einzeln quantitativ ausgewertet werden. Die spezifisch gefärbten Bereiche der Zielstruktur wurden über einen manuell festgelegten Schwellenwert definiert, wobei alle Werte die oberhalb des Schwellenwertes lagen als positiv gefärbt definiert wurden. Die restlichen Werte wurden als Hintergrundsignal ignoriert. Der manuell definierte Schwellenwert wurde für alle histologischen Aufnahmen einer Färbung beibehalten. Die Färbungen wurden als Prozent der Fläche quantifiziert.

Um die Färbungen morphometrisch auszuwerten wurde die Leica *Analysis Software* (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) benutzt. Mit der Software wurden die verschiedenen Größenmessungen des Aortenursprungs und der *A. carotis* durchgeführt.



## 2.16 Hyaluronsäure Quantifizierung im Plasma

Die Quantifizierung der Hyaluronsäure im Plasma der Versuchstiere erfolgte mit Hilfe des *Hyaluronic Acid Test Kit* (Corgenix, Colorado, USA). Die Methode beruht auf der Bindung von Hyaluronsäure an ein enzym-gekoppeltes Hyaluronsäure-bindendes Protein (HAbP). Das unverdünnte Plasma und die Standards wurden in einer HAbP-beschichteten Mikrotiterplatte inkubiert, wodurch die in den Proben vorhandene Hyaluronsäure mit dem immobilisierten HAbP reagierte. Durch Waschen wurde ungebundene HA entfernt, anschließend wurde den Proben HRP-konjugiertes HAbP zugesetzt. So kam es zur Komplexbildung mit der gebundenen HA, welche in einer Farbreaktion mit Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid sichtbar gemacht wurde. Die Farbintensität wurde mit einem ELISA-Microplate Reader (Bio-Rad, München, Deutschland) bei 450 nm gemessen.

## 2.17 Real-time-quantitative PCR (RTq-PCR)

### 2.17.1 RNA Präparation aus murinen Aorten

Die Präparation von Gesamt-RNA aus murinen Aorten erfolgte mittels TriReagent<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland). Die Aorten wurden in flüssigen Stickstoff überführt und pulverisiert. Die pulverisierten Aorten wurden in je 500 µl TriReagent<sup>®</sup> aufgenommen. Anschließend wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verfahren. Dies umfasste das Ausschütteln der wässrigen, phenolhaltigen Phase des TriReagents<sup>®</sup> gegen Chloroform, eine Fällung der in der wässrigen Phase angereicherten RNA mit Isopropanol und einen anschließenden Waschschriff mit 70 % Ethanol. Die so erhaltene RNA wurde in RNase-freiem Wasser aufgenommen und bei -80 °C eingefroren und gelagert. Konzentration und Reinheit der RNA wurde durch Messung der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm mit einem Nanodrop-1000 (Peglab, Erlangen, Deutschland) photometrisch bestimmt.

### 2.17.2 Quantifizierung der mRNA mittels RTq-PCR

Die Quantifizierung des Expressionsniveaus der Zielgene wurde mittels RTq-PCR durchgeführt. Ein Mikrogramm der Gesamt-RNA wurde zur Synthese von cDNA mittels des *Superscript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis-Systems* (Invitrogen, Karlsruhe,

Deutschland) umgeschrieben. Die Reaktionen der nachfolgenden PCR wurden unter Benutzung des *SYBR Green<sup>®</sup> PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) auf einer Opticon 1 Platte (MJ-Research, Waltham, MA, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Eine Schmelzkurvenanalyse wurde nach Beendigung der PCR durchgeführt, um die Spezifität der verwendeten Primer und Bedingungen zu kontrollieren. Der Vergleich der relativen Expressionsniveaus wurde über die  $2^{\Delta\Delta C(T)}$  Methode erreicht, wobei jede Probe als Dreifachbestimmung analysiert und ein Mittelwert gebildet wurde.

## **2.18 Blutdruckmessung**

Die Messung von Blutdruck und Herzfrequenz erfolgte an 13 bis 15 Wochen alten Mäusen mittels einer nicht invasiven, photoplethysmographischen Methode<sup>151</sup>, bei der eine Druckmanschette um den Schwanz der Mäuse gelegt wurde (BP-2000 Blood Pressure Analysis System, Visitech Systems, Apex, USA). Ein Photosensor unter dem Schwanz und eine Lichtquelle über dem Schwanz haben den Blutfluss als Änderung der Lichtdurchlässigkeit gemessen, dargestellt als Pulsamplitude. Bei einem erhöhten Druck in der Manschette verringerte sich die Amplitude des Blutflusses. Der Druck in der Manschette entsprach dem systolischen Blutdruck. Die über die Druckmanschette erfassten Daten wurden mittels der Herstellersoftware „*Blood pressure analysis*“ (Visitech Systems, Apex, USA) aufgezeichnet. Die Blutdruckmessungen der Mäuse wurden an zehn aufeinander folgenden Tagen, immer zur selben Tageszeit, durchgeführt. Um die Mäuse an die Prozedur der Blutdruckmessung zu gewöhnen, wurden sie an den ersten sieben Tagen mit jeweils drei Messzyklen von je zehn Einzelmessungen trainiert. Die Messdaten der Versuchstage acht bis zehn wurden für die statistische Auswertung dieses Versuches verwendet.

## **2.19 Messung der Endothelfunktion an isolierten murinen Aorten**

Um die Endothelfunktion 25 Wochen alter Mäuse zu bestimmen, wurde eine Organbad-Messapparatur verwendet. Die Apparatur bestand aus doppelwandigen Glasgefäßen, die mit Krebs-Henseleit-Puffer gefüllt waren und durch ein Umwälzthermostat-Wasserbad (NB22, Haake, Karlsruhe, Deutschland) konstant auf

37°C erwärmt wurden. Der in den Organbädern enthaltene Krebs-Henseleit-Puffer wurde während des gesamten Versuchsverlaufs über feinporige Glasfritten mit Carbogen begast. Die Kontraktion der isolierten 5 mm breiten thorakalen Aortenringe wurde über einen Kraftaufnehmer, der an einen Verstärker angeschlossen war, an einen Schreiber (SE-120, ABB, Mannheim, Deutschland) weitergeleitet. Die Apparatur wurde vor jedem Versuch mit Gewichten kalibriert um standardisierte Messungen zu erhalten. Die isolierten Aortenringe wurden unmittelbar nach der Präparation zwischen zwei triangelförmig gebogene Drähte aus Edelstahl gespannt. Der untere Draht wurde an einer Halterung fixiert und der obere Draht mittels eines Polyesterfadens mit dem Kraftaufnehmer verbunden. In der Organbad-Messapparatur wurden immer Aortenringe zweier Mäuse gleichzeitig untersucht. Pro Versuchstier wurden ein intakter Aortenring und ein Aortenring mit entferntem Endothel verwendet. Die eingespannten Aortenringe wurden für ca. 60 Minuten äquilibriert, bis sich der Vasotonus nicht mehr spontan veränderte. In dieser Zeit wurde der Puffer alle 20 Minuten ausgewechselt und die Vorspannung der Aortenringe über Mikrometerschrauben eingestellt. Um die Funktionalität der Gefäße zu überprüfen wurden die Aortenringe zweimal mit 80 mM KCl depolarisiert, wodurch bei einem intakten Gefäß die maximal mögliche Kontraktion ausgelöst wird. Im weiteren Versuchsverlauf wurde das KCl ausgewaschen bis sich der Vasotonus nicht mehr spontan veränderte und die Vorspannung erneut auf den Ausgangswert eingestellt. Zur Untersuchung der endothelabhängigen Relaxation wurden die Aortenringe mit 0,2  $\mu$ M Phenylephrin vorkontrahiert und anschließend durch kumulative Zugabe von Acetylcholin in Konzentrationen von 1 nM bis 10  $\mu$ M relaxiert. Die Folgekonzentration wurde jeweils nach Einstellung des Maximaleffektes zugegeben und eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve über den angegebenen Konzentrationsbereich aufgezeichnet. Auswaschen und Äquilibration erfolgten jeweils wie zuvor beschrieben. Um die Sensitivität der Aortenringe auf exogen zugegebenes NO zu untersuchen, wurden nach einer erneuten Vorkontraktion mit Phenylephrin, kumulative Dosen des NO-Donors S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin (SNAP, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) in Konzentrationen von 1 nM bis 10  $\mu$ M zugegeben.

## 2.20 Bestimmung der Blutungszeit

Die Blutungszeit der Mäuse wurde durch das sogenannte „*tail cut bleeding*“ bestimmt. Die Tiere wurden mittels *i.p.* Injektion von Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg) narkotisiert und auf ein 35°C vorgewärmtes Gelkissen (3M Health Care, Borken, Deutschland) gelegt. Der Schwanz wurde zusätzlich für fünf Minuten in ein Gefäß mit 45°C warmen Wasser gehalten, um die Blutgefäße zu dilatieren. Nach der Desinfektion des Schwanzendes wurden die letzten 2 mm vom distalen Schwanzende mit einer Rasierklinge entfernt. Der Schwanz wurde umgehend in ein 50 ml Falcon Reaktionsgefäß überführt, welches mit 40 ml warmen Wasser gefüllt war. Es wurde die Zeit vom Abschneiden der Schwanzspitze bis zum vollständigen Sistieren der Blutung bestimmt.

## 2.21 Messung der Thromboseneigung

Um den Blutfluss in der *Arteria carotis communis* zu messen, wurden die Mäuse in einem Alter von 25 Wochen mit einer *i.p.* Injektion von Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg) narkotisiert. Die *A. carotis* wurde durch einen Schnitt in die Haut freigelegt und vorsichtig vom umgebenden Gewebe gelöst. Die zur Messung des Blutflusses verwendete Doppler-Sonde (Transonic Systems Inc. Ithaca, NY, USA) wurde sorgsam unter das freipräparierte Gefäß geschoben. Anschließend wurde den Mäusen über einen Katheter in der Halsvene der photochemische Farbstoff Rose Bengal (Acros Organics, Geel, Belgien) in einer Konzentration von 50 mg/kg injiziert. Durch Laserbestrahlung (Melles Griot, Bensheim, Deutschland) an der freigelegten *A. carotis* wurde nun lokal Rose Bengal aktiviert und in Folge die Freisetzung von Radikalen induziert, die eine Schädigung der Endothelzellen verursachen. Alle Messungen wurden mit der Software *Chart 5 for Windows* (ADInstruments, Spechbach, Deutschland) aufgezeichnet und ausgewertet. Die zellulären Bestandteile des Blutes reflektieren die Wellen der Doppler-Sonde und aus der daraus resultierenden Frequenzverschiebung der Schallwellen kann das Volumen des pro Zeiteinheit durch das Gefäß geflossenen Blutes berechnet werden<sup>152</sup>. Anhand der aufgezeichneten Blutflusskurven wurde die Zeit bis zur ersten vollständigen Okklusion, die Zeit bis zu einer stabilen Okklusion sowie die Häufigkeit einer spontanen Thrombusablösung bestimmt. Dabei wurde die Zeit bis zum ersten vollständigen Verschluss des Gefäßes (Blutfluss = 0 ml/min) als "Zeit bis zur ersten

Okklusion“ definiert. Dauerte der vollständige Verschluss des Gefäßes länger als zehn Minuten ohne spontane Ablösung des Thrombus an wurde dies als Zeitpunkt der stabilen Okklusion festgelegt. Eine Wiederherstellung des Blutflusses auf einen Wert  $> 0,09$  ml/min wurde als spontane Thrombusablösung und Wiederherstellung der Perfusion definiert und die Anzahl der spontan abgelösten Thromben bis zum Erreichen einer stabilen Okklusion ausgewertet.

## 2.22 Plättchenaktivierung

Um die Blutplättchenaktivierung und das endogene Thrombinpotential zu analysieren wurden 25 Wochen alte Mäuse mit einer Überdosis von Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg) getötet. Via Herzpunktion wurde den Tieren das Blut entnommen und sofort weiterverarbeitet. Im direkten Anschluss wurde durch Zentrifugation bei 3000 rpm für 45 Sekunden plättchenreiches Plasma (PRP) gewonnen. Zur Bestimmung des Plättchenanteils wurde das PRP 1:10 in PBS verdünnt. 25  $\mu$ l verdünntes PRP wurden mit 5  $\mu$ l PE-konjugiertem *rat-anti-mouse* anti CD41 Antikörper (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) versetzt und 30 Minuten inkubiert. Nach Verdünnung mit 500  $\mu$ l Isotone<sup>®</sup> (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) wurde die Plättchenzahl unter Verwendung eines Cyomics FC 500 Cytometers (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) bestimmt. Plättchenreiches Plasma wurde charakterisiert durch einen Anteil von 98-99 % positiver Ereignisse. Als Isotypenkontrolle wurde der entsprechende PE-konjugierte *mouse* IgG1-PE Antikörper (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) verwendet. Um den Aktivierungszustand der Plättchen zu untersuchen wurde die Oberflächenexpression von P-Selektin (CD62P) mittels FACS Analyse gemessen. In ruhenden Plättchen ist P-Selektin vollständig in den  $\alpha$ -Granula der Plättchen gespeichert und nicht an der Oberfläche detektierbar. Das Ausmaß der P-Selektin-Oberflächenexpression ist direkt mit dem Ausmaß der Plättchenaktivierung korreliert. Zur Bestimmung der P-Selektin-Oberflächenexpression wurde der FITC-konjugierte *rat-anti-mouse* anti-CD62P Antikörper (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) und die entsprechende FITC-konjugierte Isotypkontrolle, *mouse* IgG1-FITC (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) verwendet, wie von Zimmermann *et al.*, 2003 beschrieben<sup>153</sup>. Um Unterschiede in der maximalen Aktivierbarkeit der Plättchen zu detektieren, wurde das plättchenreiche Plasma für fünf Minuten mit 5  $\mu$ g/ml

Convulxin vorinkubiert, um anschließend wie beschrieben die CD62P Oberflächenexpression im FACS zu messen. Zur Analyse wurde die CXP Analysis Software 2.2 (Canimpex Enterprises, CA, USA) verwendet.

## **2.23 Endogenes Thrombinpotential**

Die Messung der Thrombinbildung ist eine Methode, um Funktion und Aktivität des Blutgerinnungssystems zu testen. Bei der Messung des endogenen Thrombinpotentials (ETP) wird Citrat-antikoaguliertes Plasma mit einer *Tissue Factor*-Quelle und negativ geladenen Phospholipiden (Plättchenmembranen) inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe eines Rekalzifizierungspuffers, der das fluorogene Thrombin-Substrat Z-Gly-Gly-Arg-AMC (Bachem, Bubendorf, Schweiz) enthält, gestartet. Nach spezifischer proteolytischer Spaltung durch Thrombin wird der Fluoreszenz-Farbstoff AMC (7-Amino-4-methylcumarin) freigesetzt, dessen Fluoreszenz bei 390 nm Exzitations- und 460 nm Emissionswellenlänge gemessen werden kann. Zur Bestimmung des Thrombinpotentials in murinem plättchenarmen Plasma (PPP) wurde die Methode von Hemker *et al.* modifiziert<sup>154</sup>. Für jede Einzelmessung wurden 15 µl PPP, 10 µl Plättchenmembranen, 1 pmol Innovin als *Tissue Faktor*-Quelle, 55 µl PBS und 20 µl Rekalzifizierungspuffer verwendet. Jede biologische Probe wurde einer Dreifachbestimmung unterzogen und die erhaltenen Werte gemittelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des plättchenarmen Plasmas gestartet. Das für diese Messung verwendete PPP wurde aus dem PRP für die Messung der Plättchenaktivierung durch 10-minütige Zentrifugation bei 3000 x g gewonnen. Anschließend wurde die Thrombin-Bildung für 60 Minuten mit einem Mehrkanal Fluoreszenz-Messgerät (Fluoroskan Ascent, Thermo Electron Corporation) beobachtet. Die sich ergebenden Kurven wurden mit der Thrombinoscope Analysis Software 3.0 ausgewertet. Die Fläche unter der Kurve entspricht der gesamten maximalen Thrombinaktivität der untersuchten Proben und schließt Unterschiede in der Expression der Gerinnungsfaktoren sowie Aktivität endogener Aktivatoren und Inhibitoren mit ein.

## 2.24 Elektronenmikroskopische Darstellung der Glykokalyx

Zur elektronenmikroskopischen Darstellung der Glykokalyx in den Kapillargefäßen des Herzens 25 Wochen alter Mäuse wurden die Tiere durch eine *i.p.* Injektion von Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg) narkotisiert. Anschließend wurden die Tiere wie von Luft 1966 beschrieben mit einer 0,3 %-igen Rutheniumrot Fixations-Lösung für 30 Minuten durch den linken Ventrikel perfundiert<sup>155</sup>. Kleine Stücke des Herzmuskels (< 2 mm<sup>3</sup>) wurden nach der Perfusion entnommen und in dieser Fixierlösung für zwei Stunden bei RT unter leichtem Schütteln aufbewahrt. Anschließend wurden die Stücke in 0,1 M Cacodylat-Puffer überführt, dreimal für 20 Minuten gewaschen und über Nacht bei 4°C in Cacodylat-Puffer gelagert. Am nächsten Tag wurde das Gewebe für drei Stunden bei RT auf einem Schüttler in Cacodylatpuffer nachfixiert. Anschließend wurde erneut dreimal für 20 Minuten mit 0,1 M Cacodylat-Puffer gewaschen. Die Gewebestücke wurden für je 45 Minuten in eine aufsteigende Alkoholreihe mit 30, 50, 70, 80, 90 und 96 % Alkohol überführt. Nach der Alkoholreihe wurden die Gewebestücke dreimal für zehn Minuten in 100 % Ethanol gewaschen und anschließend dreimal 20 Minuten mit Propylenoxid behandelt. Um die Gewebe auf die Einbettung vorzubereiten, wurden diese in verschiedene Epon-Propylenoxid Gemische (1:2, 1:1 und 2:1) für je eine Stunde überführt. Über Nacht wurden die Gewebestücke in purem Epon bei RT gelagert. Die Gewebe wurden in Flacheinbettungsschalen aus Silicon eingebettet und für 48 Stunden bei 60°C polymerisiert. Die so erhaltenen Epon-Blöcke wurden an einem Ultramikrotom (Ultracut, Reichert-Jung) auf eine Dicke von 80 nm geschnitten. Die Schnitte wurden an einem Transmissions-Elektronen-Mikroskop (EM 902A, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 80 KV und bei 3000 bis 14000-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten mit einer MegaView II slow-scan-CCD Kamera und der Software ITEM<sup>®</sup> 5.0 (Soft-imaging-systems, Münster, Deutschland). Die Aufnahmen wurden als nicht-komprimierte TIFF-Dateien mit 16 bit Graustufen ausgegeben.

Die Quantifizierung der Fläche der Glykokalyx wurde an fünf Stellen pro Aufnahme und an sieben Aufnahmen pro Tier mit der Software ImageJ (NIH, USA) durchgeführt. Mittels ImageJ wurde eine definierte Fläche von 200 x 300 Pixel auf die apikale Plasmamembran der Endothelzelle gelegt und ausgewertet. Die Fläche die von der Glykokalyx ausgefüllt wurde, wurde prozentual zur Gesamtfläche berechnet. Darüber hinaus wurde die Dicke der Glykokalyx mittels der Leica Analysis Software (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) an 20 Stellen pro Aufnahme vermessen.

Als Kontrollversuch wurden die Tiere vor der Perfusion mit der Rutheniumrot-Fixationslösung mit Hyaluronidase (*Streptomyces hyalurolyticus*, 20 IU/ml) perfundiert, um so den Hyaluronsäure-Anteil der Glykokalyx abzubauen.

## **2.25 Erzeugung einer Neointimahyperplasie durch Ligatur der *Arteria carotis communis***

Zur Erzeugung einer konzentrischen Neointimahyperplasie wurde eine Ligatur an der *Arteria carotis communis sinister* analog zu der von Kumar *et al.* beschriebenen Methode durchgeführt<sup>148</sup>. Die Narkose der Mäuse wurde durch *i.p.* Gabe von Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg) eingeleitet. Die *A. carotis* wurde durch einen ca. 1 cm langen Schnitt mit Hilfe zweier Mikroknüpfpinzetten (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) freigelegt. Anschließend wurde eine Fadenschlaufe aus nicht resorbierbarer Perma-Hand Seide (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) nahe der Bifurkation zur *A. carotis interna* und *A. carotis externa* angelegt und mit angemessenem Druck zugezogen. Die Wunde wurde schichtweise vernäht, die Haut wurde geklammert (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland). Um den Flüssigkeitsverlust während der Operation auszugleichen, wurde den Mäusen 500 µl 0,9 % isotoner NaCl-Lösung *i.p.* verabreicht. Nach dem Eingriff erfolgte eine Analgesie mit Buprenorphin in einer Dosierung von 0,05 bis 0,08 mg/kg Maus *s.c.*, welche sechs Stunden nach dem Eingriff wiederholt wurde.

## **2.26 Statistik**

Die Messdaten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus n unabhängigen Experimenten angegeben. Das Signifikanzniveau P für  $\alpha$  wurde mit 0.05 festgelegt. Um signifikante Unterschiede zwischen drei oder mehr Versuchsgruppen zu überprüfen, wurden die Daten mittels *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) und nachfolgendem Bonferroni-Test für multiple Vergleiche analysiert. Um Unterschiede zwischen drei und mehr Versuchsgruppen und mehreren Bedingungen zu untersuchen, wurden die Daten mittels *Two-Way Analysis of Variance* (ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Test für multiple Vergleiche analysiert. Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen wurden mit einem ungepaarten „Student`s t-Test“ untersucht. Das Konfidenzintervall betrug 95 %. Die statistische Auswertung erfolgte



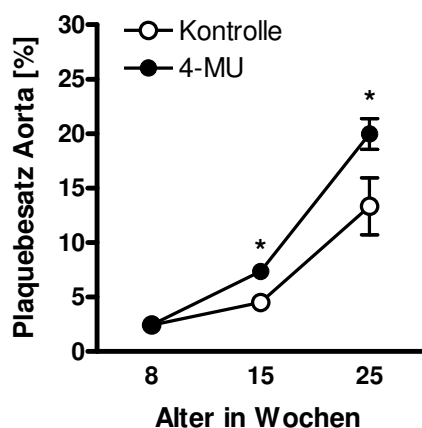
mittels der GraphPad Prism-Software (Version 4.00, GraphPad Software, San Diego, USA).

### 3 Ergebnisse

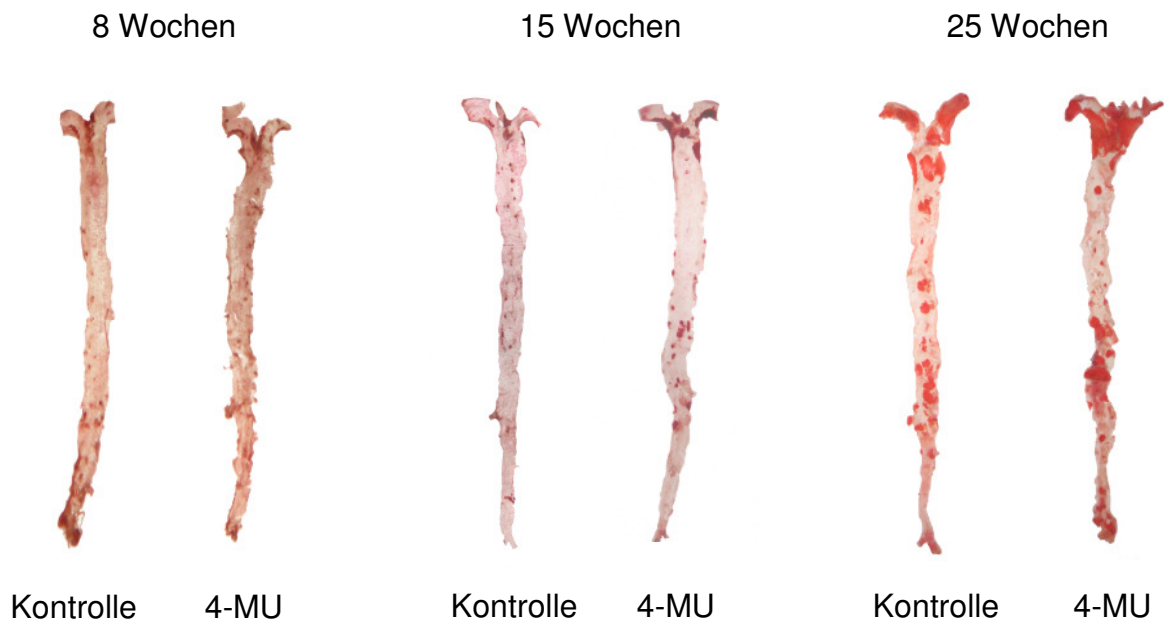
#### 3.1 Einfluss von Kurz-, Intermediär- und Langzeitbehandlung mit 4-MU auf die Entstehung der Atherosklerose

##### 3.1.1 4-MU steigert den Plaquebesatz der Aorta und des Aortenursprungs

Um den Effekt des Hyaluronsäure-Syntheseinhibitors 4-Methylumbelliferon auf die Atherosklerose zu untersuchen, wurde der Plaquebesatz der Aorta mittels einer *en face Oil-red-O* Lipidfärbung quantifiziert. Interessanterweise zeigte die histologische Färbung eine deutliche Zunahme des Anteils atherosklerotischer Plaques an der Gesamtfläche der Aorten von 4-MU behandelten ApoE-defizienten Mäusen bei chronischer Behandlung (Abbildung 3-1). Die vier Wochen behandelten Tiere zeigten noch keinerlei Unterschiede im Plaquebesatz der Aorten. Der Plaquebesatz lag hier durchschnittlich bei 2,4 % bezogen auf die Gesamtfläche der Aorta. Die Auswertung des Plaquebesatzes nach elf Wochen Behandlung ergab eine signifikante Erhöhung unter 4-MU Behandlung im Vergleich zur Kontrolle. Die Gabe von 4-MU steigerte den Plaquebesatz um knapp 38 % im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren. Ein vergleichbarer Effekt durch die Behandlung mit 4-MU war auch in den Aorten der 21 Wochen gefütterten Tiere nachweisbar. Hier stieg der Plaquebesatz der Aorten unter 4-MU um 33 % im Vergleich zur Kontrolle an (Abbildung 3-1).

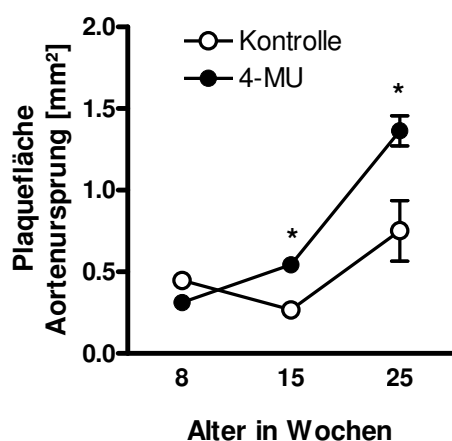


**Abbildung 3-1** Digitale Bildanalyse des Plaquebesatzes der Aorten im Zeitverlauf von 4, 11 und 21 Wochen behandelten ApoE-defizienten Mäusen. Die unbehandelten Kontrollen zeigten durchweg einen niedrigeren Plaquebesatz der Aorten als die 4-MU behandelten Tiere. Nach 11 Wochen Behandlung konnte ein signifikanter Unterschied im Plaquebesatz der unbehandelten Tiere mit  $4,5 \pm 0,5$  % zu dem Plaquebesatz von  $7,3 \pm 0,5$  % der 4-MU behandelten Tiere gezeigt werden. Dieser signifikante Unterschied konnte auch bei 21 Wochen behandelten Tieren detektiert werden. Hier zeigten die Kontrollen einen Plaquebesatz von  $13,3 \pm 2,6$  %, die 4-MU Behandlung führte zu einem Anstieg des Plaquegehaltes auf  $19,9 \pm 1,4$  %. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 5$  Tiere pro Gruppe; \*,  $p < 0.05$  vs. Kontrolle.



**Abbildung 3-2** Exemplarische Darstellung aufgeschnittener Aorten im Zeitverlauf, die einer *en face* Oil-red-O Lipidfärbung unterzogen wurden. Die für Lipide positiven Bereiche färbten sich rot.

Da 4-MU unerwarteter Weise den Plaquebesatz der Aorten erhöht, wurde untersucht, ob sich auch die Plaquegröße im Aortenursprung unter der 4-MU Behandlung pro-atherosklerotisch veränderte. Wie der Zeitverlauf zeigte, hatten die unbehandelten Tiere im Alter von 8 Wochen eine größere Plaquefläche im Bereich des Aortenursprungs als die mit 4-MU behandelten Tiere. Die Plaquefläche der 15 Wochen alten Tiere stieg unter 4-MU Behandlung signifikant um über 50 % im Vergleich der Plaquefläche der Kontrollgruppe an. Dieser Trend setzte sich bei den 25 Wochen alten Tieren fort, auch hier war die Plaquefläche des Aortenursprungs unter 4-MU Behandlung signifikant erhöht (Abbildung 3-3).

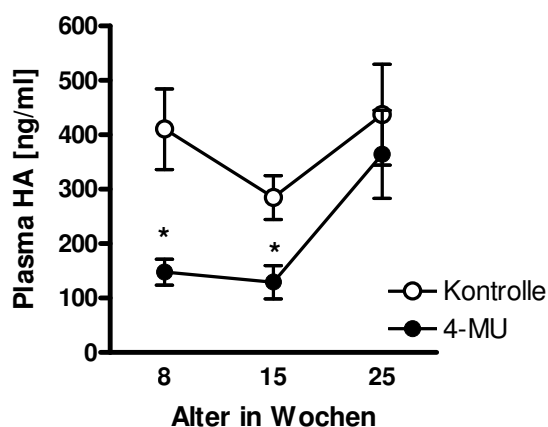


**Abbildung 3-3** Morphometrische Auswertung der Plaquegröße des Aortenursprungs im Zeitverlauf von 8 über 15 zu 25 Wochen in ApoE-defizienten Mäusen. Im Alter von 8 Wochen haben die unbehandelten Tiere eine geringfügig größere Plaquefläche als die 4-MU behandelten Tiere. Ab dem 15 Wochen Zeitpunkt vergrößert sich die Plaquefläche der 4-MU behandelten Tiere signifikant im Vergleich zu der Plaquefläche der unbehandelten Tiere. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 5$  Tiere pro Gruppe; \*,  $p < 0.05$  vs. Kontrolle.

### 3.1.2 4-MU reduziert die HA-Konzentration im Plasma

Mittels eines HA-Test Kits wurde die Hyaluronsäure-Konzentration im Plasma der Versuchstiere bestimmt. Dies diente zur Validierung der Hyaluronsäureinhibition durch 4-MU. Der enzymatische Test zeigte während des gesamten Zeitverlaufes einen niedrigeren HA-Plasmaspiegel unter 4-MU Behandlung im Vergleich zu den Kontrollen.

Die Konzentration an Hyaluronsäure im Plasma der 8 Wochen alten Tiere wurde durch die 4-MU Behandlung signifikant um etwa 50 % gegenüber dem HA-Plasmagehalt der Kontrolle gleichen Alters gesenkt. Eine ebenfalls signifikante Reduktion des HA-Plasmaspiegels wurde auch bei den 15 Wochen alten Tieren beobachtet, hier reduzierte die Behandlung mit 4-MU den HA-Plasmaspiegel um über 55 % im Vergleich zur Kontrolle. Die unter Kurzzeit und intermediärer Behandlung mit 4-MU erzielte signifikante Reduktion der Menge an Hyaluronsäure im Plasma wurde in den 25 Wochen alten Tieren nicht nachgewiesen. Hier wurde der HA-Plasmaspiegel um lediglich 25 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert (Abbildung 3-4).

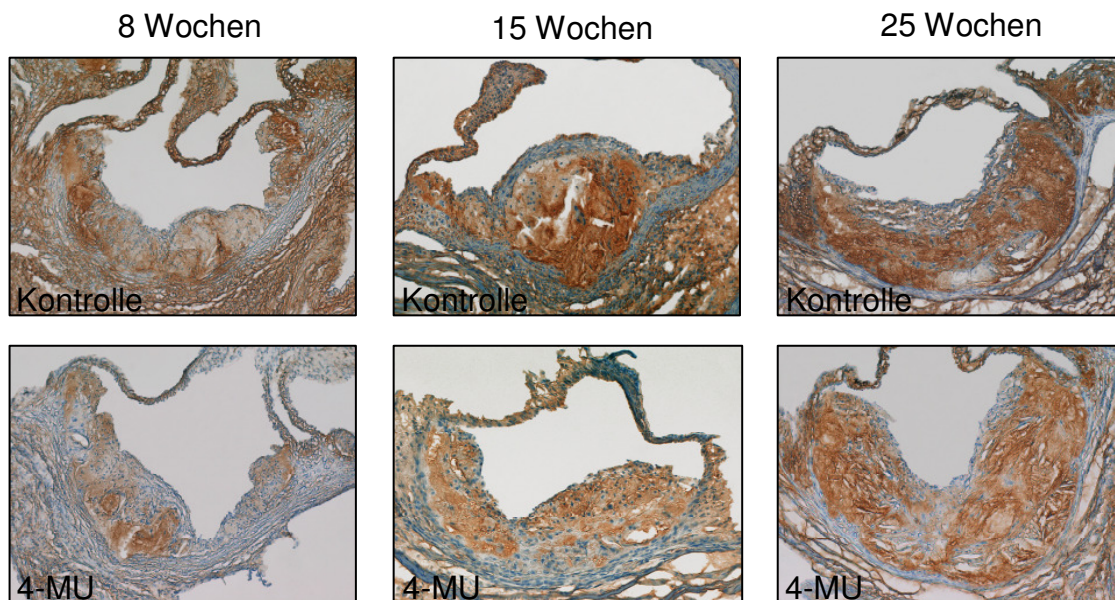


**Abbildung 3-4** Zeitverlauf der Hyaluronsäure-Konzentration im Plasma. Dargestellt sind die 8, 15 und 25 Wochen Zeitpunkte. 4-MU senkt den HA-Gehalt im Plasma. Diese Reduktion ist bei dem 8 und 15 Wochen Zeitpunkt signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Der HA-Gehalt liegt bei dem 25 Wochen Zeitpunkt unter dem der Kontrolle, jedoch ist die Reduktion hier nicht mehr signifikant. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 5$  Tiere pro Gruppe; \*,  $p < 0.05$  vs. Kontrolle.

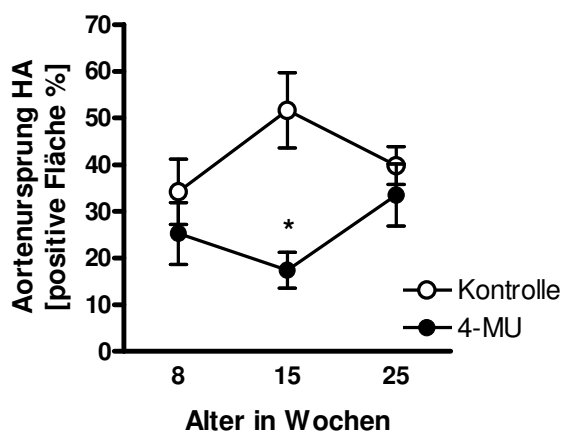
### 3.1.3 4-MU senkt den HA-Gehalt im Aortenursprung

Nachdem gezeigt wurde, dass die Hyaluronsäure-Konzentration im Plasma unter 4-MU reduziert und die Plauegröße des Aortenursprungs unter 4-MU erhöht wurde, war es naheliegend den Hyaluronsäuregehalt in den Plaques des Aortenursprungs immunhistologisch zu untersuchen.

Der Hyaluronsäuregehalt der Plaques des Aortenursprungs war durch die 4-MU Behandlung im Vergleich zur Kontrolle zu jedem untersuchten Zeitpunkt reduziert (Abbildung 3-5). Nach einer vierwöchigen Behandlung mit 4-MU kam es zu einer 48 %-igen Reduktion des Hyaluronsäuregehalts in den Plaques des Aortenursprungs im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Diese Reduktion des HA-Gehaltes unter 4-MU wurde bei dem 15 Wochen Zeitpunkt noch einmal auf 66 % im Vergleich zur Kontrolle gesenkt. Unter der Behandlung mit 4-MU zeigte sich bei den 25 Wochen alten Tieren eine Reduktion des HA-Gehaltes im Aortenursprung im Vergleich zur Kontrolle, diese Reduktion war mit 15 % im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant.



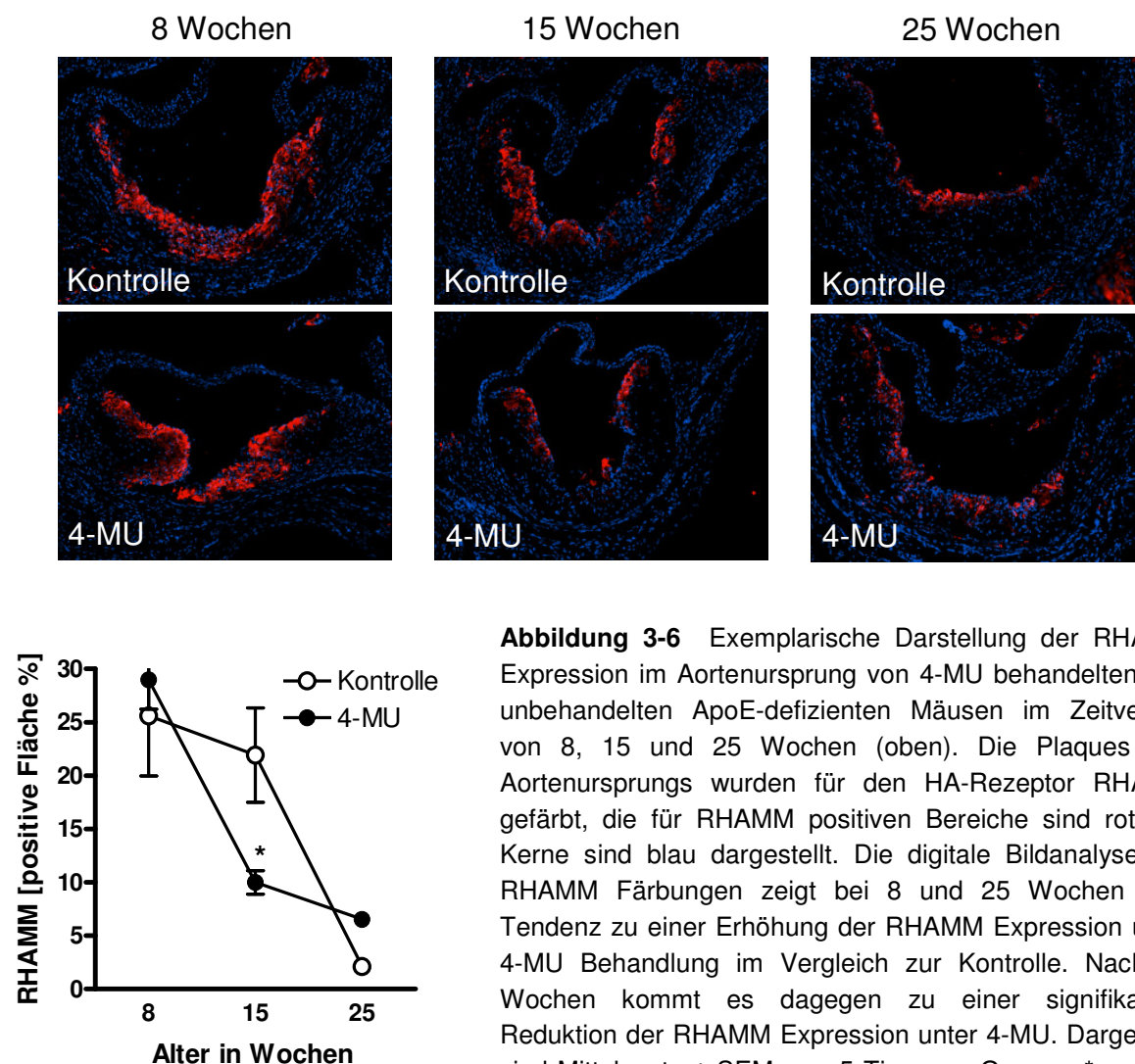
**Abbildung 3-5** Exemplarische Darstellung von Plaques des Aortenursprungs im Zeitverlauf von 8, 15 und 25 Wochen alten ApoE-defizienten Mäusen nach Fütterung mit Western Diät ohne (obere Reihe) und mit 10 mg/g\*d 4-MU (untere Reihe). Im Aortenursprung wurde Hyaluronsäure angefärbt. Die für Hyaluronsäure positiven Bereiche sind braun dargestellt. Die Zellkerne wurden blau gegengefärbt. Die



digitale Bildanalyse der Hyaluronsäure ergab bei unbehandelten Kontrollen zu allen Zeitpunkten einen höheren HA-Gehalt in den Plaques im Vergleich mit den 4-MU behandelten Tieren. Bei 8 und 15 Wochen ist die Senkung des HA-Gehalts signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Bei dem 25 Wochen Zeitpunkt ist der HA-Gehalt unter 4-MU zwar immer noch reduziert, jedoch nicht mehr signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 5$  Tiere pro Gruppe; \*,  $p < 0.05$  vs. Kontrolle.

### 3.1.4 RHAMM Expression im Aortenursprung

Als nächstes wurde der Einfluss von 4-MU auf den Hyaluronsäurerezeptor RHAMM durch immunhistochemische Färbungen im Aortenursprung untersucht. Die densitometrische Auswertung der Färbung im Zeitverlauf ergab, dass 4-MU einen zeitabhängigen Einfluss auf die Expression von RHAMM hat. Bei dem 8 Wochen Zeitpunkt war die RHAMM Expression unter 4-MU im Vergleich zur Kontrolle nur geringfügig erhöht. Die RHAMM Expression der 15 Wochen alten Tiere war niedriger als die Expression der acht Wochen alten Tiere. Wenn man die Behandlungsgruppen des 15 Wochen Zeitpunktes untereinander vergleicht führt die Behandlung mit 4-MU zu einer signifikanten, 50 %-igen, Reduktion der RHAMM Expression im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Die 25 Wochen alten Tiere zeigten eine unter 4-MU nicht signifikant, erhöhte Expression von RHAMM im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3-6).



**Abbildung 3-6** Exemplarische Darstellung der RHAMM Expression im Aortenursprung von 4-MU behandelten und unbehandelten ApoE-defizienten Mäusen im Zeitverlauf von 8, 15 und 25 Wochen (oben). Die Plaques des Aortenursprungs wurden für den HA-Rezeptor RHAMM gefärbt, die für RHAMM positiven Bereiche sind rot, die Kerne sind blau dargestellt. Die digitale Bildanalyse der RHAMM Färbungen zeigt bei 8 und 25 Wochen eine Tendenz zu einer Erhöhung der RHAMM Expression unter 4-MU Behandlung im Vergleich zur Kontrolle. Nach 15 Wochen kommt es dagegen zu einer signifikanten Reduktion der RHAMM Expression unter 4-MU. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 5$  Tiere pro Gruppe; \*,  $p < 0.05$  vs. Kontrolle.

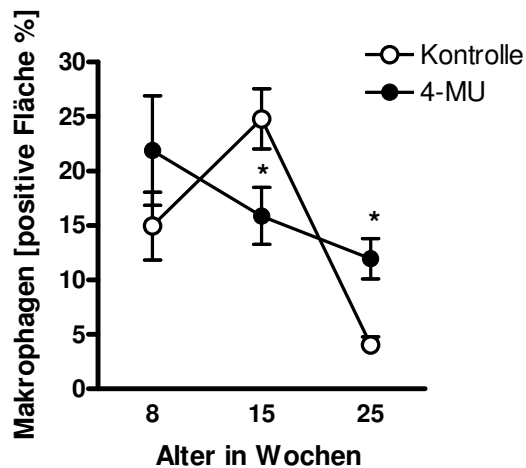
## **3.2 4-MU steigert die Inflammation während der Entstehung der Atherosklerose**

### **3.2.1 4-MU verändert den Zeitverlauf der Makrophagenexpression im Aortenursprung**

Da die Inflammation eine treibende Kraft in der Entstehung und Progression der Atherosklerose ist und die Behandlung mit 4-Methylumbelliferon in einer signifikant gesteigerten Atherosklerose resultierte, wurde der Aortenursprung der Versuchstiere auf Makrophagen untersucht, um so einen Eindruck über das Ausmaß der Invasion von Entzündungszellen zu gewinnen.

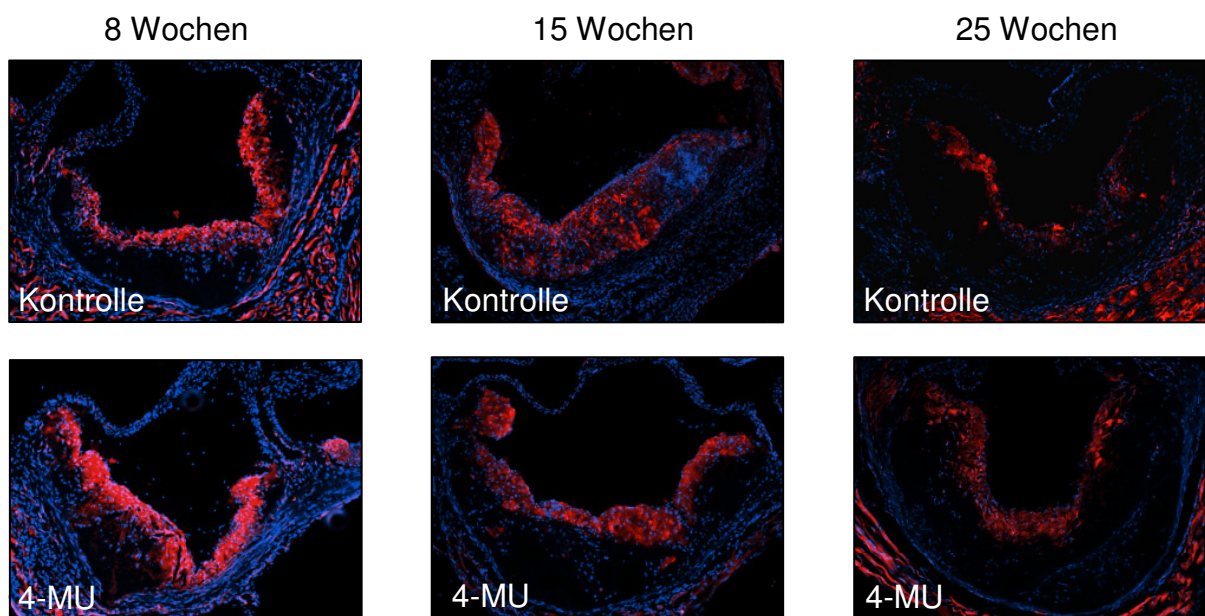
Der Zeitverlauf der Makrophageninfiltration in das vaskuläre Gewebe zeigte für die unbehandelten Kontrollen einen typischen Verlauf. In einem Lebensalter von 8 Wochen steigt die Inflammation steil an und erreichte kurz vor 15 Wochen ihren Höhepunkt. Ab 15 Wochen sinkt die Zahl der Makrophagen weit unter das Niveau der 8 Wochen alten Tiere ab (siehe auch 3.4). Die 4-MU behandelten Tiere hatten einen von den Kontrolltieren zeitlich deutlich abweichenden Verlauf der Makrophagen-Akkumulation. Bei dem untersuchten Zeitverlauf von 8 bis 25 Wochen, befindet sich das Maximum der Makrophagen-Akkumulation unter 4-MU Behandlung bei 8 Wochen und sinkt dann mit zunehmendem Alter ab. Im Alter von 8 Wochen konnte durch die Gabe von 4-MU eine deutliche Zunahme der Makrophagen festgestellt werden. Die Makrophagen-Akkumulation lag bei den 8 Wochen alten 4-MU gefütterten Tieren über 35 % höher als bei den Kontrolltieren des gleichen Zeitpunktes. Der Höhepunkt der Makrophagen-Infiltration der Kontrolltiere konnte bei 15 Wochen festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt ist die Makrophagen-Akkumulation unter 4-MU im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant gesenkt. Bei dem untersuchten 25 Wochen Zeitpunkt ist die Makrophagen-Akkumulation der Kontrolltiere geringer als die der 4-MU behandelten Tiere. Die Makrophagen-Akkumulation liegt hier nach 4-MU Behandlung 65 % höher als bei den Kontrolltieren (Abbildung 3-7).





**Abbildung 3-7** Die digitale Bildanalyse der Makrophagen-Akkumulation im Zeitverlauf von 8 bis 25 Wochen in ApoE-defizienten Mäusen. Die Makrophagen-Akkumulation der Kontrolltiere steigt von der 8. bis zur 15. Woche drastisch an und fällt bis zur 25. Woche weit unter die Expression der 8 Wochen alten Tiere ab. Die Makrophagen-Akkumulation der 4-MU behandelten Tiere hat bei 8 Wochen bereits ihren Höhepunkt erreicht und sinkt von da an langsam aber konstant bis zu 25 Wochen ab. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 5$  Tiere pro Gruppe; \*,  $p < 0.05$  vs. Kontrolle.

Nachfolgend ist der Zeitverlauf der Makrophagen-Akkumulation im Aortenursprung von unbehandelten und 4-MU behandelten Tieren dargestellt (Abbildung 3-8).



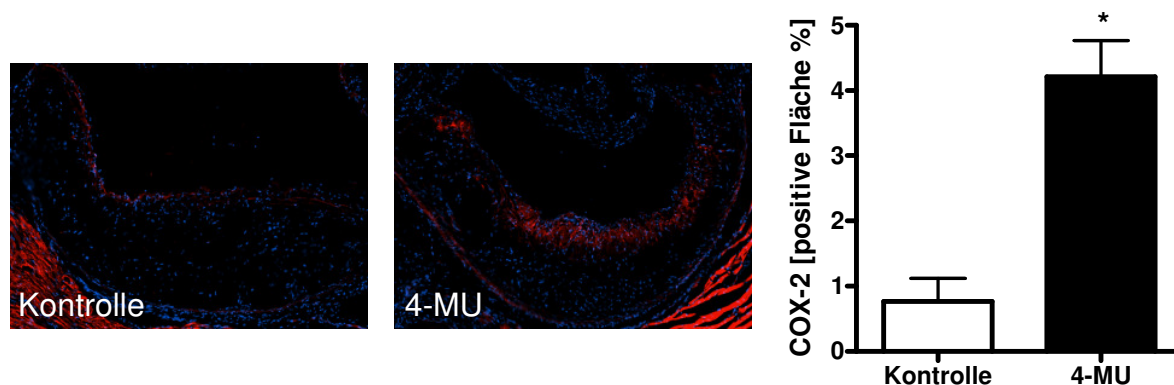
**Abbildung 3-8** Exemplarische Darstellung des Zeitverlaufes der Makrophagen in Plaques des Aortenursprungs von 8 über 15 zu 25 Wochen alten ApoE-defizienten Mäusen. Die für Makrophagen positiven Bereiche sind rot dargestellt, die Kerne sind blau angefärbt.



### 3.2.2 4-MU erhöht die Expression von COX-2 im Aortenursprung

Um neben der Makrophageninfiltration einen weiteren Parameter für den Verlauf der Inflammation zu untersuchen, wurde die Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Expression im Aortenursprung der ApoE-defizienten Mäuse untersucht. COX-2 wurde ausgewählt, da die Expression von COX-2 zum einen durch Entzündungsmediatoren wie Interleukin-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  gefördert wird und zum anderen in Makrophagen exprimiert wird. Da wir unter der 4-MU Behandlung eine verstärkte Makrophagen-Infiltration beobachten konnten, ist eine Veränderung der COX-2 Expression unter 4-MU zu vermuten.

Die Expression der Cyclooxygenase-2 wurde im Aortenursprung in der abklingenden Phase der Inflammation bei 25 Wochen alten Tieren untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die 4-MU Behandlung zu einem signifikanten Anstieg der COX-2 in den Plaques führte. Der Anstieg der COX-2-Expression in den 4-MU behandelten Tieren betrug 80 % im Vergleich zu der Kontrolle (Abbildung 3-9).

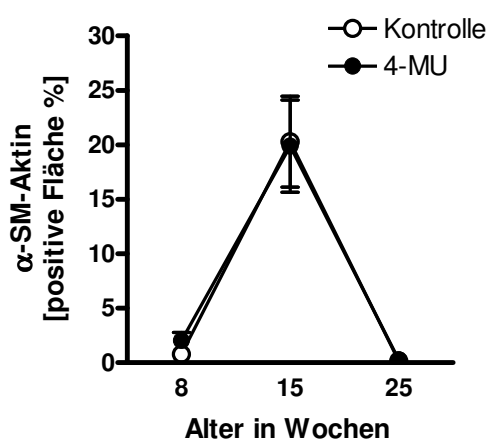


**Abbildung 3-9** Exemplarische Darstellung eines Plaques des Aortenursprungs ApoE-defizienter Mäuse in einem Alter von 25 Wochen. Die digitale Bildanalyse der COX-2 Immunhistochemie ist rechts zu sehen. Die Behandlung mit 4-MU führte zu einem signifikanten Anstieg der COX-2-Expression. Die unbehandelten Kontrollen zeigten eine COX-2-Expression von  $0,76 \pm 0,3$  %, welche unter 4-MU Behandlung auf  $4,21 \pm 0,5$  % anstieg. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 5$  Tiere pro Gruppe; \*,  $p < 0.001$  vs. Kontrolle.

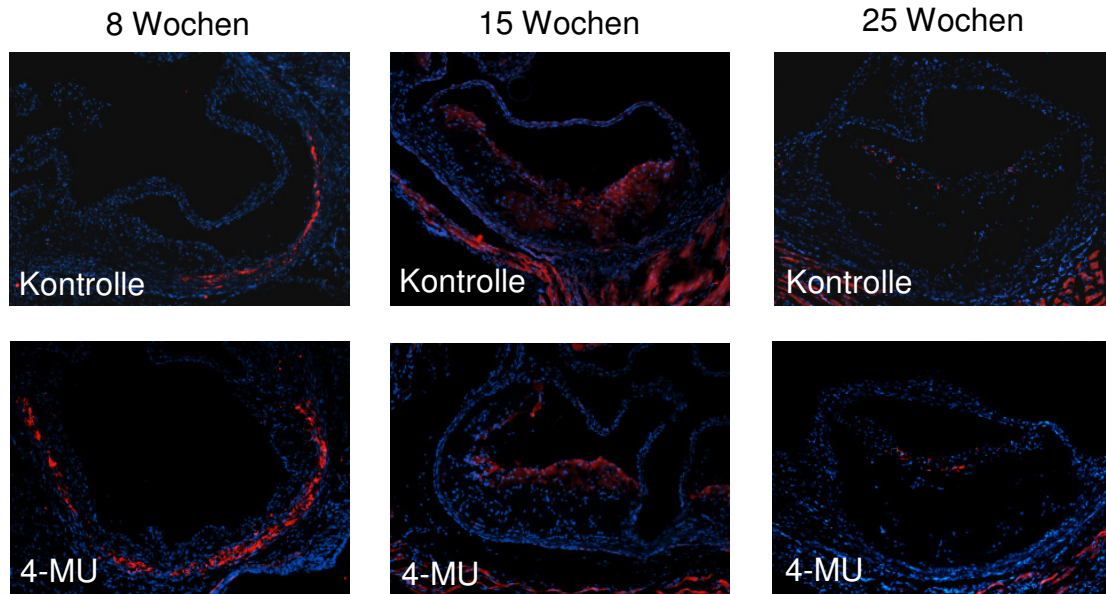
### 3.3 4-MU hat keinen Einfluss auf glatte Muskelzellen und die extrazelluläre Matrix

Da eine Behandlung mit 4-Methylumbelliferon zu einer Exazerbation der Atherosklerose führt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine veränderte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix unter 4-MU für die Veränderungen im Zeitverlauf der Atheroskleroseprogression verantwortlich ist. Um den Einfluss von 4-MU auf die extrazelluläre Matrix zu untersuchen wurden die wichtigsten Bestandteile der EZM atherosklerotischer Plaques sowie der Gehalt an VSMC auf Veränderungen untersucht.

Die morphometrischen Auswertungen des Aortenursprungs zeigten eine größere Plaquesfläche unter 4-Methylumbelliferon. Somit lag die Vermutung nahe, dass es unter 4-MU zu einer vermehrten Proliferation und Anreicherung von glatten Muskelzellen in den Plaques kommt. Diese Vermutung konnte durch die immunhistologischen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Über den gesamten Zeitverlauf von 8 über 15 bis hin zu 25 Wochen konnte kein Unterschied im *smooth muscle*  $\alpha$ -Aktin ( $\alpha$ -SM-Aktin)-Gehalt der Plaques des Aortenursprungs unter 4-MU Behandlung festgestellt werden. Auffällig war jedoch, dass der Aktingehalt bei den 15 Wochen alten Tieren deutlich höher war als bei den 8 und 25 Wochen alten Tieren. Dieser enorme Anstieg auf einen Aktingehalt von knapp 20 % in den Plaques, prozentual zur Gesamtfläche gemessen, wurde sowohl in der 4-MU behandelten Gruppe, als auch in der unbehandelten Gruppe festgestellt (Abbildung 3-10). Des Weiteren konnte anhand der Immunhistochemie gezeigt werden, dass die glatten Muskelzellen bei den 8 Wochen alten Tieren massiv in der vaskulären Media vorhanden sind und diese mit fortschreitender Atherosklerose in die Plaques des Aortenursprungs einwandern (Abbildung 3-11).



**Abbildung 3-10** Digitale Bildanalyse des  $\alpha$ -SM-Aktins der glatten Muskelzellen zeigt in dem Zeitverlauf von 8 über 15 zu 25 Wochen einen massiven Anstieg des Aktingehaltes bei 15 Wochen. Dieser Anstieg ist zeitabhängig und unabhängig von der Behandlung. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 5 Tiere pro Gruppe.

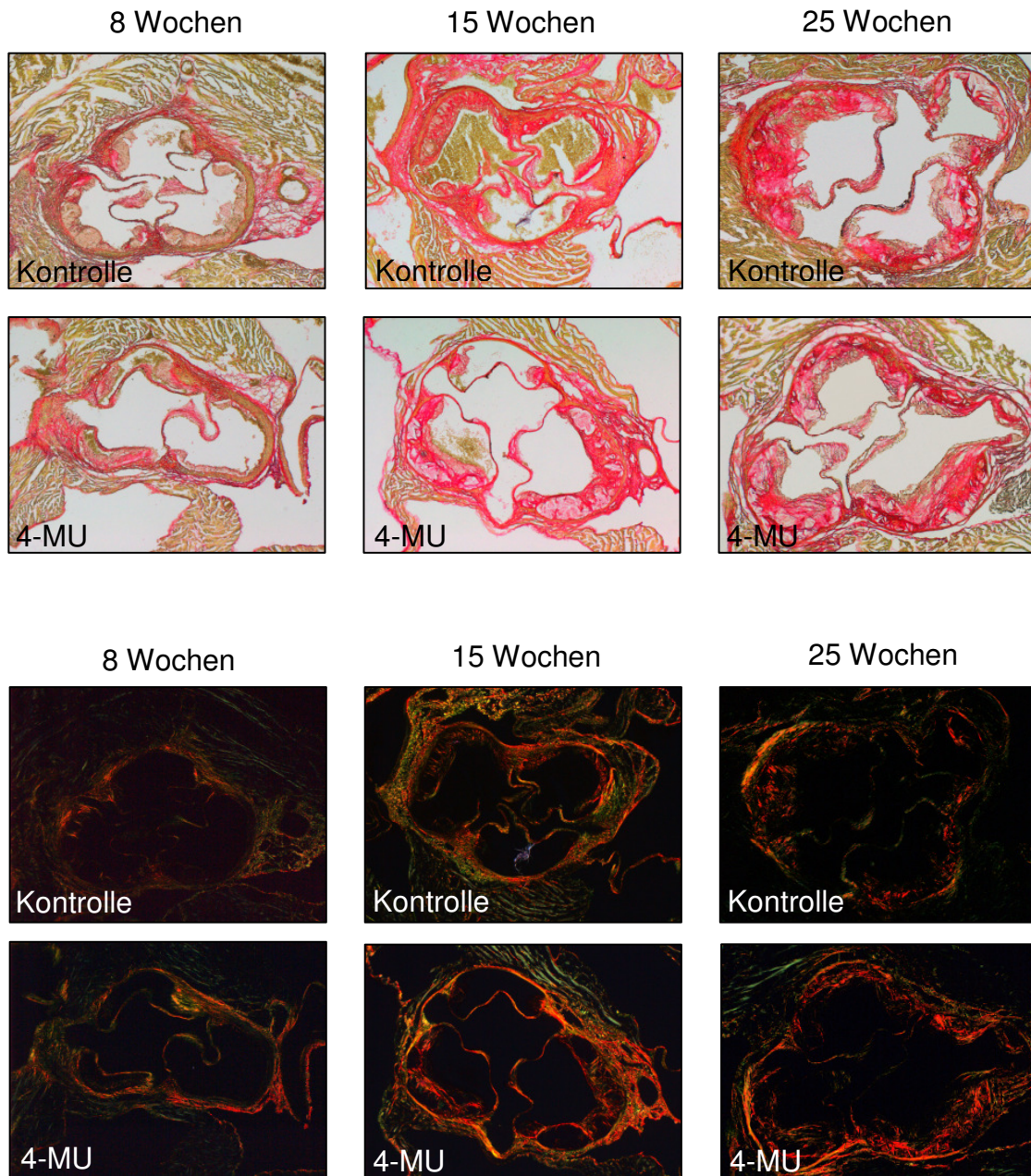


**Abbildung 3-11** Exemplarische Darstellung der Plaques des Aortenursprungs von 8 über 15 zu 25 Wochen alten ApoE-defizienten Mäusen. Der Aortenursprung wurde auf glatte Muskelzellen untersucht die in Form von  $\alpha$ -SM-Aktin, hier mittels Immunhistochemie rot angefärbt, nachgewiesen wurden.

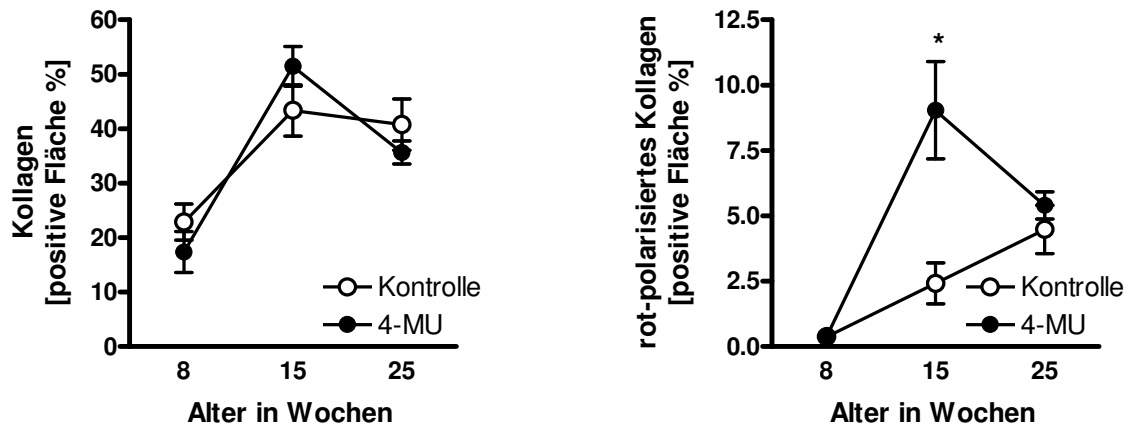
Nachdem sich der Gehalt an glatten Muskelzellen unter 4-Methylumbelliferon nicht veränderte, wurden nun Syntheseprodukte glatter Muskelzellen untersucht. Glatte Muskelzellen sind für die Synthese von Kollagen verantwortlich, welches im Folgenden histochemisch untersucht wurde. Zum einen wurde der Gesamtkollagengehalt untersucht und zum anderen die Packungsdichte der Kollagenfasern.

Über den gesamten Zeitverlauf von 8 bis 25 Wochen konnte kein signifikanter Unterschied im Gesamtkollagengehalt unter 4-MU Behandlung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 3-12). Bei den 8 Wochen alten ApoE-defizienten Mäusen zeigte die Picrosirius-Rot Färbung eine leichte Erniedrigung des Kollagengehaltes in den Plaques des Aortenursprungs unter 4-MU Behandlung. Die Reduktion des Gesamtkollagens durch 4-MU betrug knapp 20 % im Vergleich zu dem Kollagengehalt der Kontrolle. Die 15 Wochen alten Mäuse zeigten als Antwort auf die 4-MU Behandlung einen leichten, nicht signifikanten Anstieg des Kollagengehaltes in den Plaques um 15 % im Vergleich zu der Kontrolle. Auch bei den 25 Wochen alten Tieren zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Gesamtkollagen zwischen den beiden Versuchsgruppen. Der Gesamtgehalt an

Kollagen war bei der Kontrollgruppe mit ebenfalls 15 % leicht höher als der Kollagengehalt der 4-MU behandelten Tiere (Abbildung 3-13).



**Abbildung 3-12** Exemplarische Darstellung der Plaques des Aortenursprungs zu den Zeitpunkten 8, 15 und 25 Wochen ApoE-defizienter Mäuse. Der Aortenursprung wurde für Kollagen gefärbt, die Bereiche, die Kollagen enthalten, sind rot gefärbt. In der jeweiligen oberen Abbildungszeile ist der Gesamtkollagengehalt abgebildet, in der jeweiligen unteren Zeile ist die Packungsdichte des Kollagens dargestellt. Die grün gefärbten Bereiche deuten auf eine eher lose Packung der Kollagenfasern hin, wohingegen die roten Bereiche eine dichte Packung der Kollagenfibrillen darstellen. Das obere Set zeigt die unbehandelten Tiere und das untere Set zeigt die 4-MU behandelten Tiere.



**Abbildung 3-13** Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse der digitalen Bildanalyse des prozentualen Kollagengehaltes an der Gesamtfläche (links) und der Anteil rot-polarisierten Kollagens (rechts) der Plaques des Aortenursprungs von 4-MU behandelten und unbehandelten Tieren im Zeitverlauf von 8 über 15 bis zu 25 Wochen. In dem Gehalt des Gesamtkollagens zeigen sich während des gesamten Zeitverlaufes keine signifikanten Unterschiede. Das rot-polarisierte Kollagen zeigt eine hohe Packungsdichte an und wird in den 8 und 25 Wochen alten Tieren durch 4-MU nicht beeinflusst. Lediglich die 15 Wochen alten Tiere zeigen eine signifikant höhere Packungsdichte unter 4-MU Behandlung als die unbehandelten Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 5$  Tiere pro Gruppe; \*,  $p < 0.001$  vs. Kontrolle.

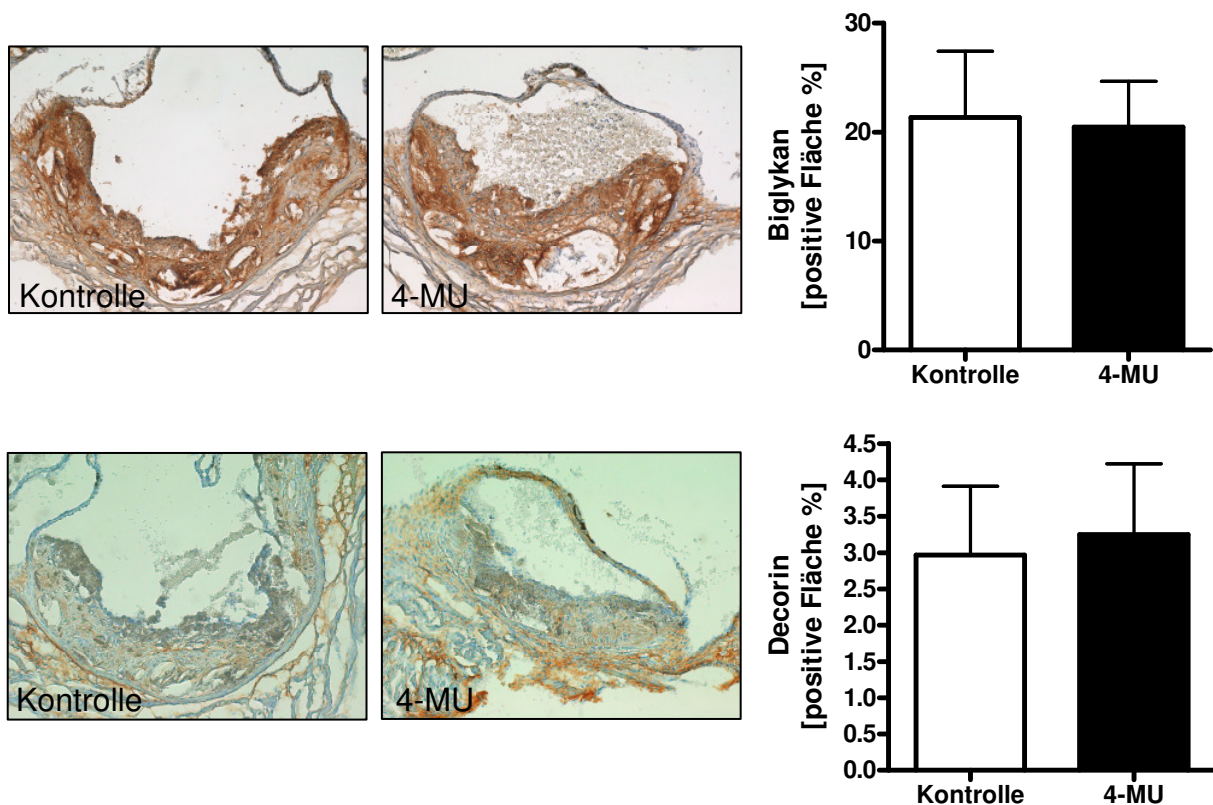
Die Packungsdichte des Kollagens war sowohl in den unbehandelten als auch in den 4-MU behandelten 8 Wochen alten Mäusen annähernd identisch. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen wurde jedoch in der Packungsdichte des Kollagens der 15 Wochen alten Mäuse unter der 4-MU Behandlung nachgewiesen. Die 4-MU behandelten Tiere hatten eine über 3,5-fach höhere Packungsdichte der Kollagenfasern als die Kontrolltiere. Dieser 4-MU Effekt auf die Packungsdichte konnte bei den 25 Wochen alten Mäusen nicht mehr beobachtet werden. Dort kam es lediglich zu einem leichten Anstieg der Packungsdichte unter 4-MU im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 3-13).

Da der Hyaluronsäuresynthese-Inhibitor 4-MU keine ausgeprägten Effekte auf die Kollagensynthese hatte, wurde zusätzlich die Expression der Proteoglykane Biglykan und Decorin untersucht. Proteoglykane werden ebenfalls von glatten Muskelzellen synthetisiert und spielen laut der „*response to retention*“ Theorie eine bedeutende Rolle in der Progression der Atherosklerose<sup>156</sup>.

Die Proteoglykane Biglykan und Decorin unterschieden sich zwar in ihrem Expressionsniveau voneinander, jedoch nicht in der Intensität der Expression zwischen den unbehandelten Kontrollen und den 4-MU behandelten Tieren. Der



Gehalt an Biglykan lag bei den Plaques des Aortenursprungs für beide Behandlungsgruppen bei 20 % der gesamten Plaquefläche. Bei dem Proteoglykan Decorin konnte ebenfalls kein Effekt von 4-MU nachgewiesen werden. Decorin wurde sowohl in den unbehandelten Tieren als auch in den behandelten Tieren in ungefähr 3 % der gesamten Plaquefläche exprimiert (Abbildung 3-14).

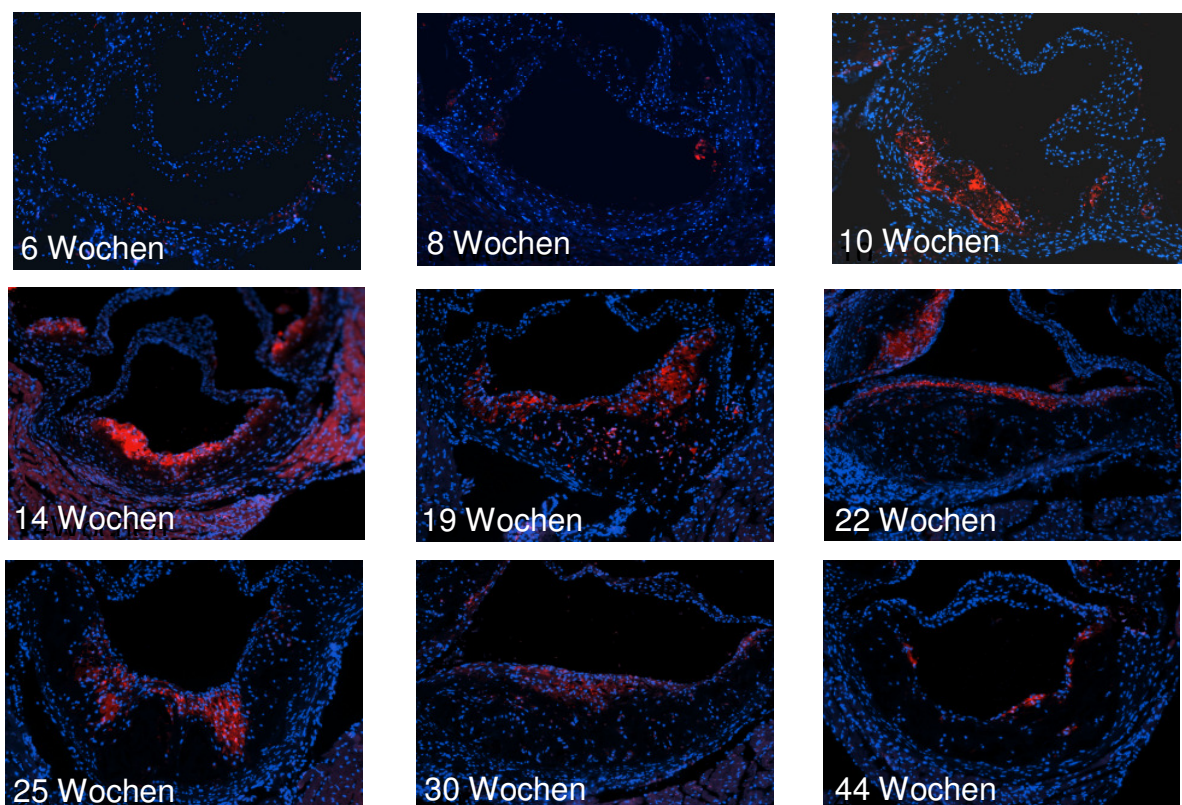


**Abbildung 3-14** Exemplarische Darstellung eines Plaques des Aortenursprungs von 15 Wochen alten ApoE-defizienten Mäusen. Der Aortenursprung wurde für die Proteoglykane Biglykan (oben) und Decorin (unten) gefärbt. Die für die jeweilige Färbung positiven Bereiche sind braun dargestellt. Die digitale Bildanalyse ist rechts von den Aufnahmen dargestellt. Die Plaques der unbehandelten Tiere haben einen durchschnittliche Biglykangehalt von  $21,4 \pm 6,1$  % der Fläche und die 4-MU behandelten Tiere haben  $20,5 \pm 4,2$  % der Fläche Biglykan in den Plaques des Aortenursprungs. Bei Decorin zeigen die Kontrollen einen Prozentsatz von  $3,0 \pm 1,0$  und die 4-MU behandelten  $3,3 \pm 1,0$  % Anteil der Plaques des Aortenursprungs. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 5$  Tiere pro Gruppe.

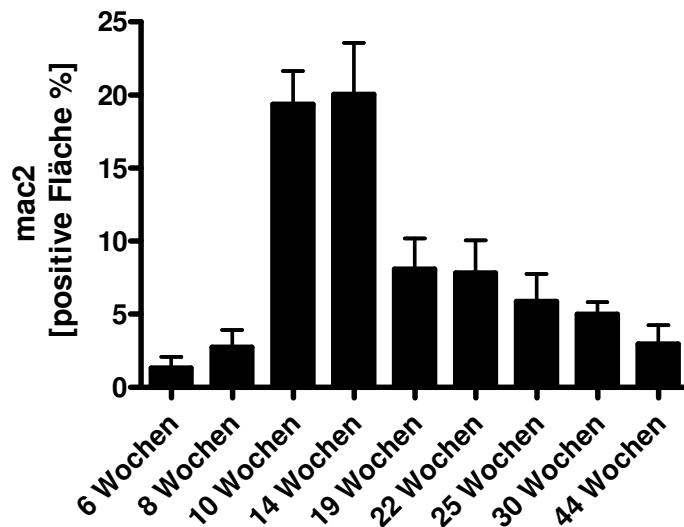
Zusammenfassend wurde in den beschriebenen Experimenten festgestellt, dass eine 4-MU Behandlung von vier bis 25 Wochen bei ApoE-defizienten Mäusen eine verstärkte Atherosklerose auslöst, die möglicherweise auf einer verstärkten Entzündungsreaktion beruht. Nachfolgend wurde untersucht, ob sich dieser pro-atherosklerotische Effekt von 4-MU auch zeigt, wenn nur kurzfristig für fünf Wochen zu Beginn der Atherosklerose behandelt wird und zweitens, wenn die Atherosklerose zu Behandlungsbeginn schon fortgeschritten ist.

### 3.4 Einfluss einer frühen Intervallbehandlung mit 4-MU auf die Atherosklerose

Um den Einfluss der Behandlung mit 4-MU im Bezug auf bestimmte Phasen der Atherosklerose spezifisch untersuchen zu können, ist eine genaue Kenntnis des zeitlichen Verlauf der Makrophagen-Akkumulation im Verlauf der Atherosklerose-entstehung notwendig. Um den genauen zeitlichen Verlauf der Inflamations-entstehung darzustellen wurde die Makrophageninfiltration in Plaques des Aortenursprungs ApoE-defizienter Mäuse auf Western Diät im Alter zwischen sechs und 44 Wochen untersucht. Anhand dieses Zeitgangs konnte gezeigt werden, dass der Höhepunkt der Inflammation zwischen der 10. und 14. Woche liegt. Die Anzahl an Makrophagen nimmt von der 8. bis zur 10. Woche sprunghaft zu und fällt nach der 14. Woche wieder stark ab. Bei 44 Wochen ist die Anzahl an Makrophagen wieder mit den 8 Wochen Werten vor der Inflamationsphase vergleichbar (Abbildung 3-15, Abbildung 3-16). Nachdem in den Untersuchungsgruppen der 4-MU behandelten Tiere eine stark erhöhte Anzahl an Makrophagen beobachtet wurde, wurde die Erkenntnis über den Inflamationsverlauf genutzt und die Tiere in verschiedenen Zeitfenstern der Inflammation behandelt.



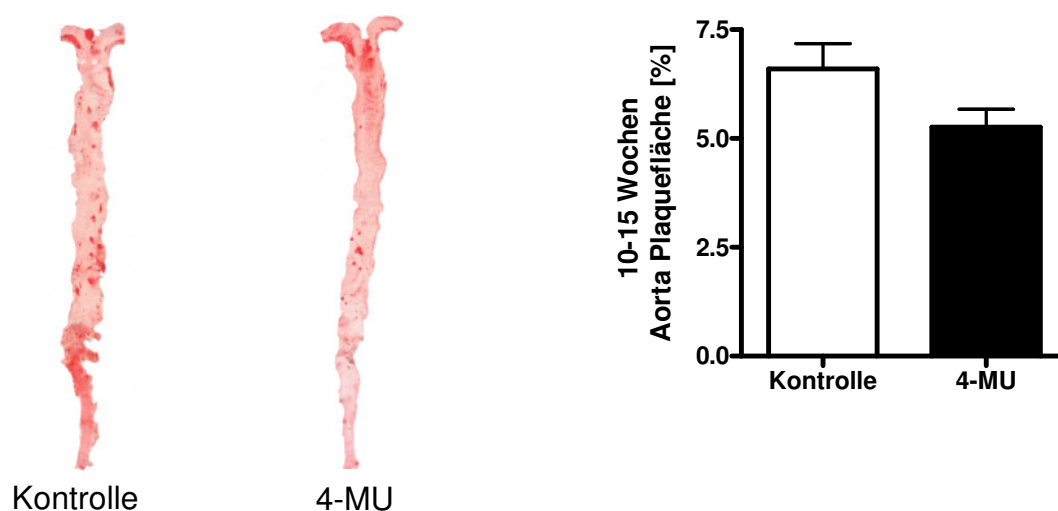
**Abbildung 3-15** Exemplarische Darstellung von Makrophagen, hier rot gefärbt, im Aortenursprung von ApoE-defizienten Mäusen auf Western Diät im Alter von 6 bis 44 Wochen.



**Abbildung 3-16** Digitale Bildanalyse der Makrophagen-Akkumulation des Western Diät Zeitgangs in ApoE-defizienten Mäusen. Der Höhepunkt der Makrophagen-Anreicherung liegt zwischen der 10. und 14. Woche. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3-7$  Tiere pro Gruppe.

### 3.4.1 Die 4-MU Behandlung in der Phase der akuten Inflammation hat keinen Einfluss auf Inflammation und HA-Expression

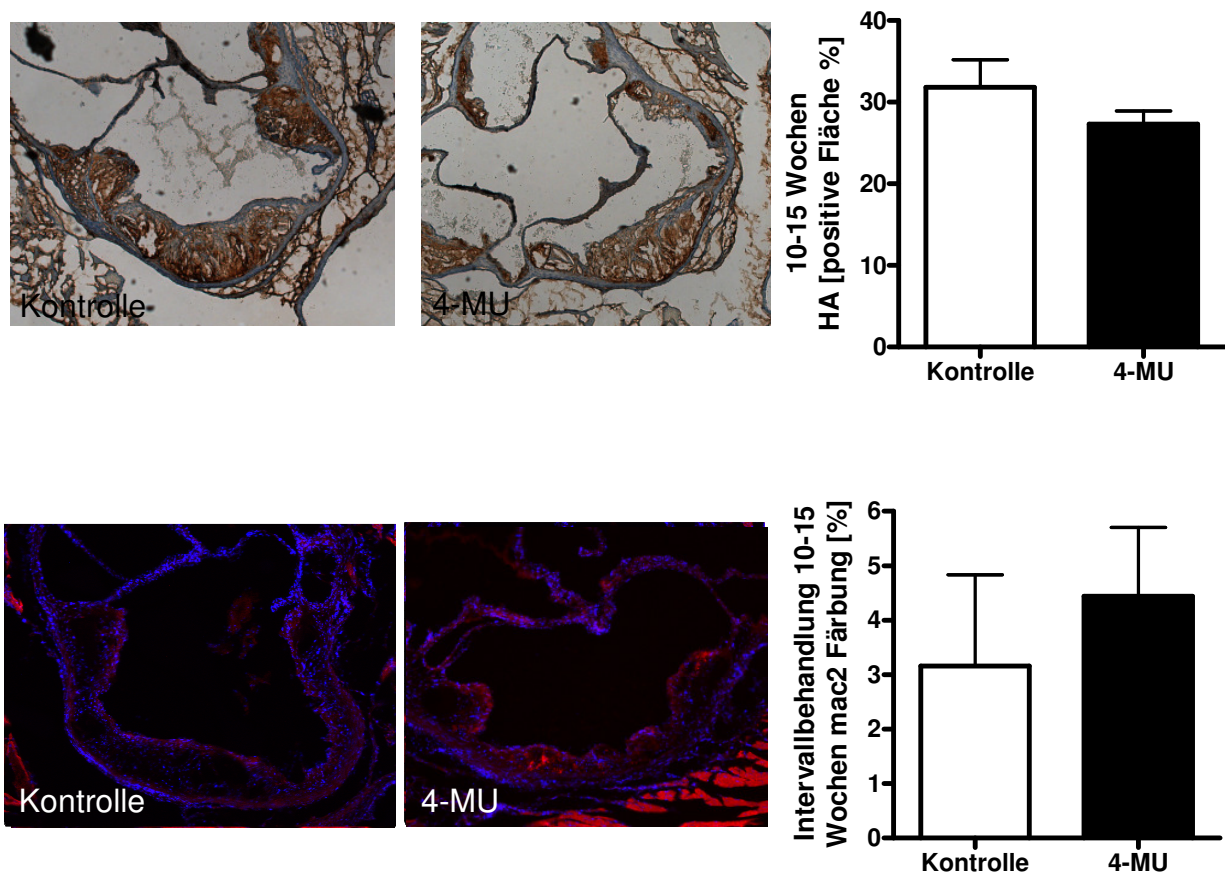
Bei der Behandlung wurden die Tiere von der 10. bis zur 15. Woche behandelt, dies entspricht genau dem Höhepunkt der Makrophagen-Akkumulation. Es konnte gezeigt werden, dass diese Behandlung mit 4-MU zu einem leicht erniedrigten Plaquebesatz in der Aorta führt. Diese Reduktion des Plaquebesatzes unter 4-MU Behandlung war nicht signifikant (Abbildung 3-17).



**Abbildung 3-17** Exemplarische Darstellung 15 Wochen alter, aufgeschnittener Aorten, an denen eine *en face* Lipidfärbung, hier rot dargestellt, durchgeführt wurde (links). Die digitale Bildanalyse des Plaquebesatzes der Aorten von 10 bis 15 Wochen behandelte Tiere zeigte mit  $5,25 \pm 0,4$  % eine leichte Reduktion unter 4-MU Behandlung im Vergleich zu  $6,60 \pm 0,6$  % der Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 6$  Tiere pro Gruppe.



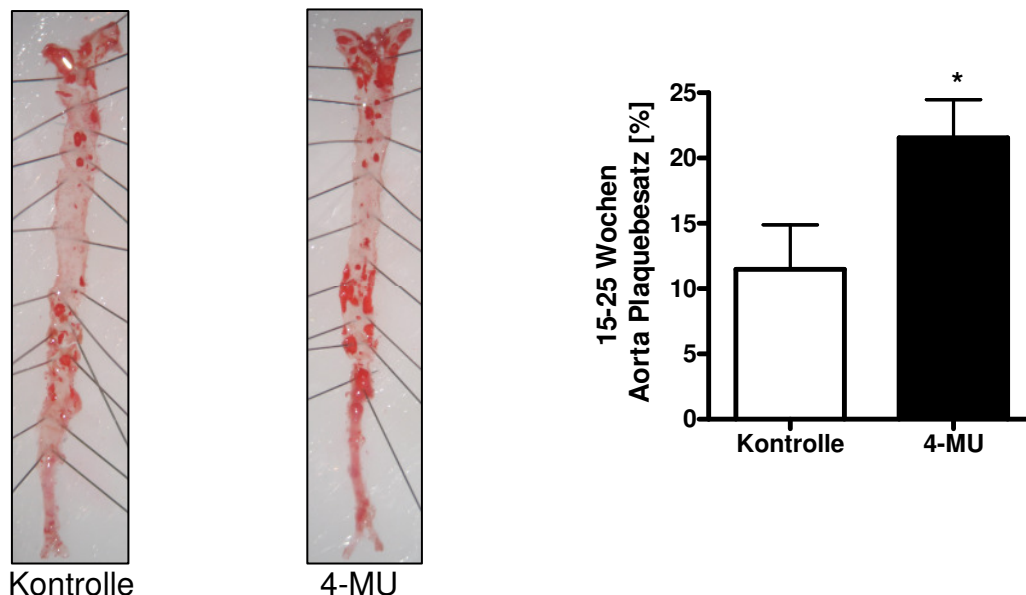
Neben dem Plaquebesatz der Gesamtaorta wurde auch der Aortenursprung auf Veränderungen hinsichtlich des Hyaluronsäure- und Makrophagen-Gehaltes untersucht. Die histologische Untersuchung des Hyaluronsäure-Gehaltes ergab, dass die 4-MU behandelten Tiere einen niedrigeren Gehalt an Hyaluronsäure hatten als die Kontrolltiere. Bei den Makrophagen verursachte die 4-MU Behandlung einen gegenteiligen Effekt. Hier wurde ein leichter Anstieg des Makrophagengehaltes im Aortenursprung unter 4-MU Behandlung im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen (Abbildung 3-18).



**Abbildung 3-18** Exemplarische Darstellung eines Plaques des Aortenursprungs, nach einer Behandlung von der 10. bis zur 15. Woche, der für Hyaluronsäure gefärbt wurde (oben). Die für Hyaluronsäure positiven Bereiche sind braun dargestellt. Die digitale Bildanalyse des Hyaluronsäure-Gehaltes ist rechts von den Photos dargestellt und zeigt eine leichte Reduktion unter 4-MU Behandlung ( $27,3 \pm 1,6$  %) im Vergleich zur Kontrolle ( $31,8 \pm 3,3$  %). In der unteren Zeile befindet sich die exemplarische Darstellung eines Plaques der für Makrophagen gefärbt wurde. Die für Makrophagen positiven Bereiche sind rot dargestellt. Die densitometrische Auswertung der Makrophagen ist rechts von den Photos abgebildet und zeigt eine leichte Erhöhung der Makrophagen unter 4-MU Behandlung ( $4,4 \pm 1,2$  %) im Vergleich zur Kontrolle ( $3,1 \pm 1,6$  %). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 6$  Tiere pro Gruppe.

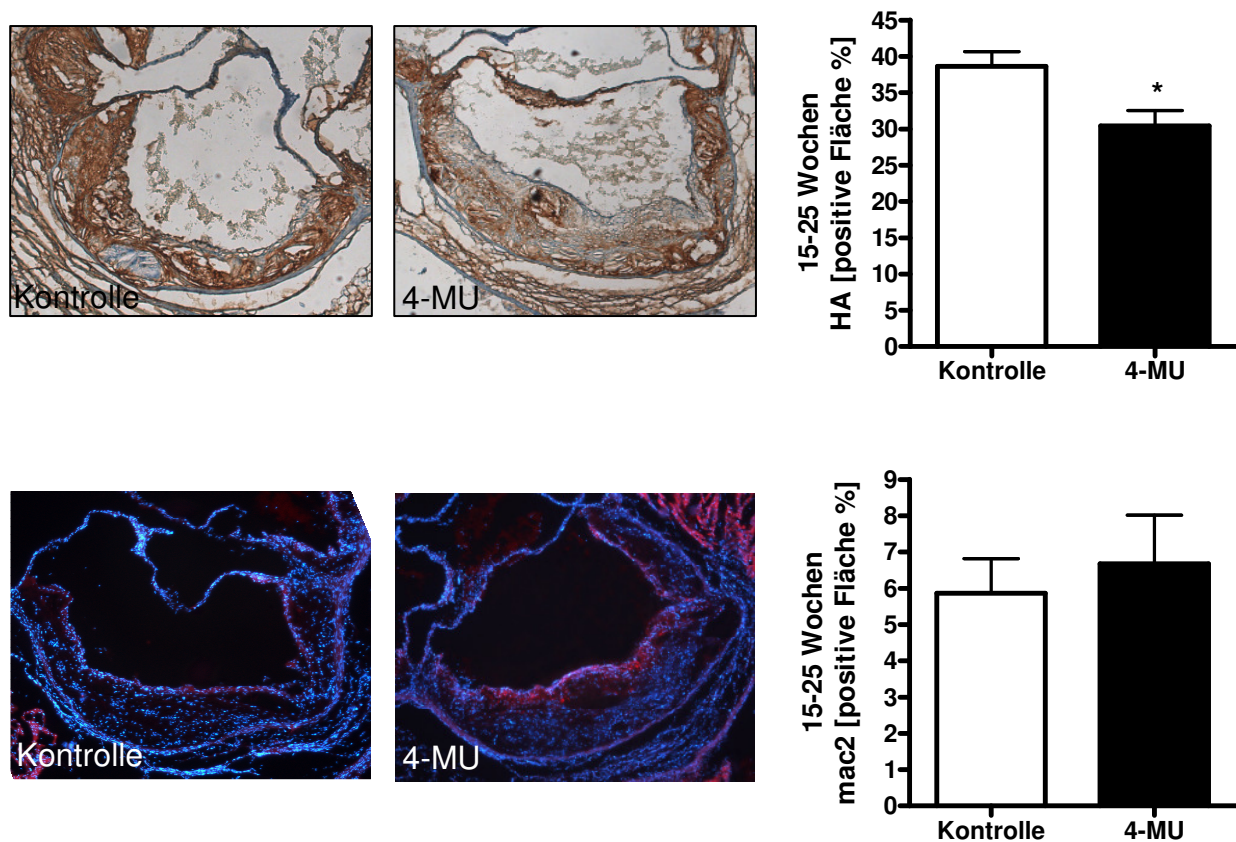
### 3.4.2 Die 4-MU Behandlung nach der Phase der akuten Inflammation führt zu einer gesteigerten Atherosklerose

In einem weiteren Untersuchungszeitraum wurden die Tiere von der 15. bis zur 25. Woche behandelt. Zu diesem Zeitpunkt war der Höhepunkt der Inflammation bereits überschritten und die Infiltration der Makrophagen in die Plaques des Aortenursprungs nimmt ab. Bei der post-inflammatorischen Behandlung mit 4-MU konnte gezeigt werden, dass der Plaquebesatz in der Aorta im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht wurde (Abbildung 3-19).



**Abbildung 3-19** Die linke Seite zeigt exemplarisch 25 Wochen alte, aufgeschnittene Aorten, mit denen eine *en face* Lipidfärbung, hier rot dargestellt, durchgeführt wurde. Die digitale Bildanalyse des Plaquebesatzes der Aorten in dem Behandlungszeitraum nach der Inflammation von 15 bis 25 Wochen zeigt eine signifikante Erhöhung des Plaquebesatzes der 4-MU behandelten Tiere. Die Kontrolltiere hatten einen durchschnittlichen Plaquebesatz von  $11,5 \pm 3,4$  % welcher unter 4-MU Behandlung auf  $21,6 \pm 2,9$  % gesteigert wurde. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 6$  Tiere pro Gruppe; \*,  $p < 0.05$  vs. Kontrolle.

Ebenso wie bei dem Behandlungszeitraum während der Inflammation wurde auch in diesem Behandlungszeitraum nach dem Höhepunkt der Inflammation der Aortenursprung auf den Hyaluronsäuregehalt und die Makrophageninfiltration untersucht. Die histologischen Untersuchungen zeigten einen unter 4-MU Behandlung signifikant erniedrigten Hyaluronsäuregehalt im Aortenursprung. Der Gehalt an Makrophagen war unter 4-MU Behandlung im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert (Abbildung 3-20).

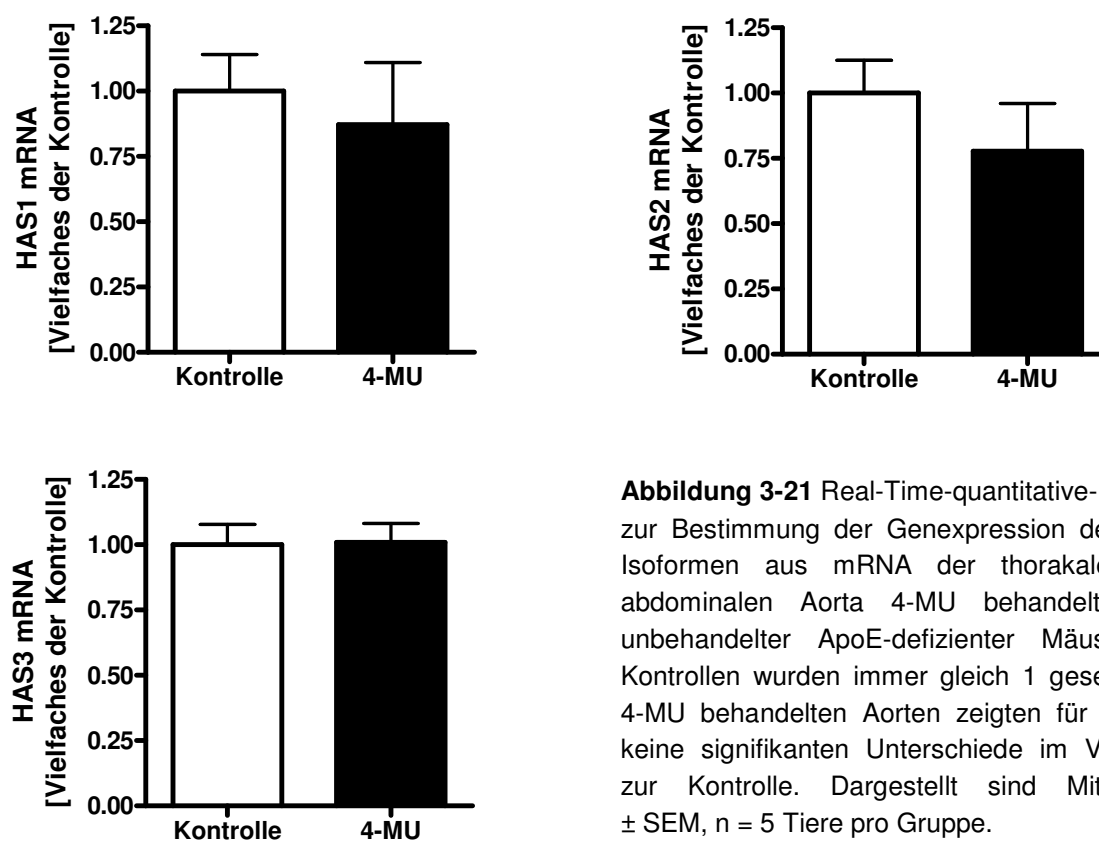


**Abbildung 3-20** Exemplarische Darstellung atherosklerotischer Plaques des Aortenursprungs, nach dem Höhepunkt der Inflammation, von der 15. – 25. Woche mit und ohne 4-MU Behandlung. (Oben) der Aortenursprung wurde für Hyaluronsäure gefärbt, die für Hyaluronsäure positiven Bereiche sind braun dargestellt. Die digitale Bildanalyse des Hyaluronsäure-Gehaltes ist rechts oben dargestellt. Die Auswertung zeigt einen signifikant reduzierten Gehalt an Hyaluronsäure im Aortenursprung unter 4-MU Behandlung (Kontrolle  $38,6 \pm 2 \%$ ; 4-MU  $30,4 \pm 2 \%$ ). In der unteren Zeile ist ein Plaque des Aortenursprungs dargestellt, der für Makrophagen gefärbt wurde. Die für Makrophagen positiven Bereiche sind rot dargestellt. Die digitale Bildanalyse der Makrophagen befindet sich rechts von den Plaquedarstellungen. 4-MU zeigte keinen Einfluss auf die Makrophagen-Akkumulation im Aortenursprung. Die Kontrolltiere haben einen durchschnittlichen Makrophagengehalt von  $5,8 \pm 0,9 \%$ , die 4-MU behandelten Tiere erreichen einen Makrophagengehalt von  $6,6 \pm 0,9 \%$ . Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 6$  Tiere pro Gruppe; \*,  $p < 0.05$  vs. Kontrolle.

### 3.5 Die HAS-Genexpression wird durch 4-MU nicht beeinflusst

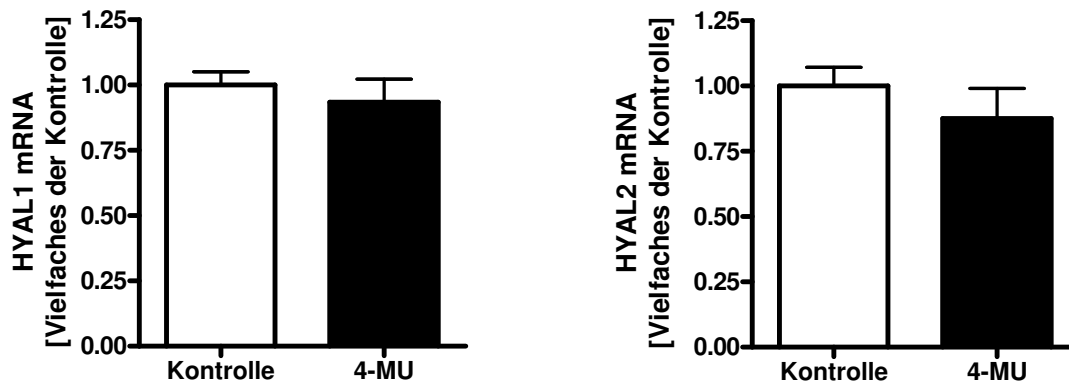
Um zu überprüfen, ob der unselektive Hyaluronsäuresynthese-Inhibitor 4-Methylumbelliferon neben der HA-Synthese auch die Expression der Hyaluronsäuresynthasen verändert, wurde die Expression der verschiedenen HAS-Isoformen in der Aorta mittels Real-Time-quantitativer-PCR (RTq-PCR) untersucht.

Die Expression der Hyaluronsäuresynthasen 1-3 (HAS1-3) zeigte zwischen den unbehandelten und 4-MU behandelten Tieren keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 3-21).



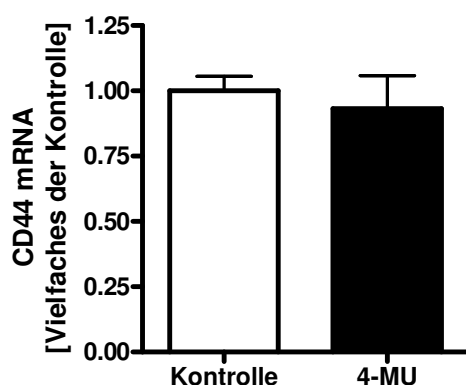
**Abbildung 3-21** Real-Time-quantitative-PCR zur Bestimmung der Genexpression der HAS-Isoformen aus mRNA der thorakalen und abdominalen Aorta 4-MU behandelter und unbehandelter ApoE-defizienter Mäuse. Die Kontrollen wurden immer gleich 1 gesetzt. Die 4-MU behandelten Aorten zeigten für HAS1-3 keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 5 Tiere pro Gruppe.

Neben den Hyaluronsäure-Synthasen wurden auch die Hyaluronsäure-abbauenden Enzyme, die Hyaluronidasen, untersucht. Auch bezüglich der Expression der Hyaluronidasen 1 und 2 konnte nach Behandlung mit 4-MU keine Beeinflussung festgestellt werden (Abbildung 3-22).



**Abbildung 3-22** Real-Time-quantitative-PCR zur Bestimmung der Genexpression der Hyaluronsäure - abbauenden Enzyme HYAL1 und HYAL2 in der thorakalen und abdominalen Aorta 4-MU behandelter und unbehandelter ApoE-defizienter Mäuse. Auf der linken Seite ist die HYAL1-Expression dargestellt und auf der rechten Seite ist die HYAL2-Expression zu sehen, 4-MU hat keinen Einfluss auf die Expression der Hyaluronidasen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 5 Tiere pro Gruppe.

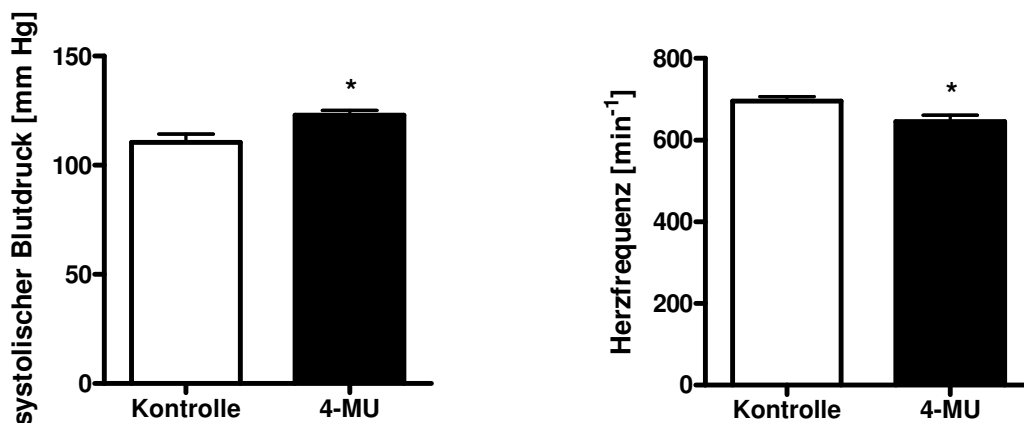
Weiterhin wurde neben den Hyaluronsäure-Synthasen und den Hyaluronidasen das Hyaladherin CD44 auf seine Expression unter Einfluss von 4-MU untersucht. CD44 ist ein Glykoprotein auf der Zelloberfläche, welches als Rezeptor für Hyaluronsäure dient. Interessanterweise war unter 4-MU kein Einfluss auf die CD44 Expression feststellbar (Abbildung 3-23).



**Abbildung 3-23** Quantitative Real-Time PCR zur Bestimmung der Genexpression des Hyaladherins CD44 in der Aorta 4-MU behandelter und unbehandelter ApoE-defizienter Mäuse. Die CD44 Expression wurde von der 4-MU Behandlung nicht beeinflusst. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 5 Tiere pro Gruppe.

### 3.6 4-MU steigert den Blutdruck

An ApoE-defizienten Mäusen beider Behandlungsgruppen wurde der systolische Blutdruck bestimmt, um eine Aussage über den Gefäßwiderstand machen zu können. Der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz wurden an den Mäusen nach einer Trainingsphase und einer Behandlungsdauer von elf Wochen gemessen, das entsprach einem Tialter von 15 Wochen. Der systolische Blutdruck war in den Tieren unter 4-MU Behandlung im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant um 12,4 mm Hg erhöht. Die Herzfrequenz war dagegen bei den mit 4-MU behandelten Tieren signifikant erniedrigt. Der Anstieg des systolischen Blutdrucks bei gleichzeitiger Abnahme der Herzfrequenz durch die Behandlung mit 4-MU deutet auf eine Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes hin (Abbildung 3-24).



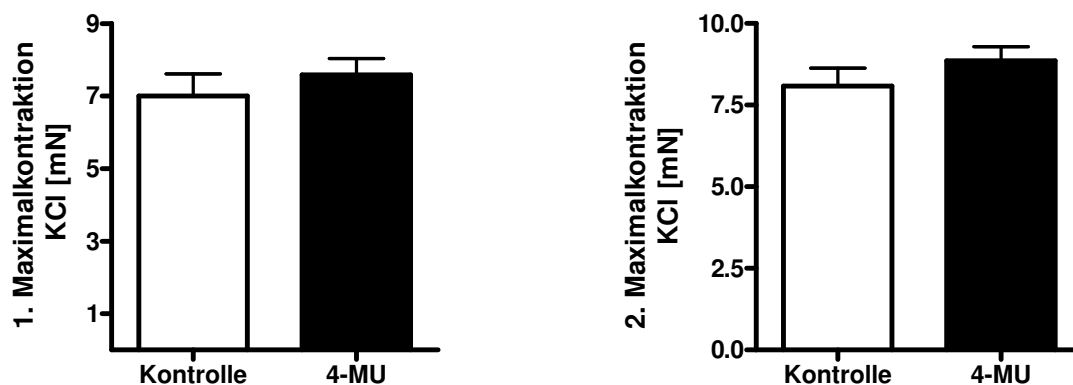
**Abbildung 3-24** Der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz wurden an den Mäusen mittels Schwanzplethymographie gemessen und sind unter 4-MU Behandlung signifikant verändert. Der Blutdruck lag bei den Kontrolltieren durchschnittlich bei  $110,5 \pm 3,8$  mm Hg und bei den 4-MU behandelten Tieren stieg dieser auf  $122,9 \pm 2,2$  mm Hg an. Bei der Messung der Herzfrequenz zeigte sich ein umgekehrtes Ergebnis, hier lag die Herzfrequenz der 4-MU behandelten Tiere mit  $649,9 \pm 14,9$  min<sup>-1</sup> signifikant niedriger als die der Kontrolltiere mit  $695,4 \pm 10,7$  min<sup>-1</sup>. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 8 Tiere pro Gruppe; \*, p < 0.05 vs. Kontrolle.

### 3.7 4-MU verschlechtert die Endothelfunktion

Da die Messung des systolischen Blutdrucks der ApoE-defizienten Mäuse eine signifikante Erhöhung unter 4-MU Behandlung im Vergleich zu der Kontrolle ergab, wurde eine Einschränkung der vaskulären Relaxation, verursacht durch eine Verschlechterung der Endothelfunktion durch 4-MU, als Ursache vermutet.

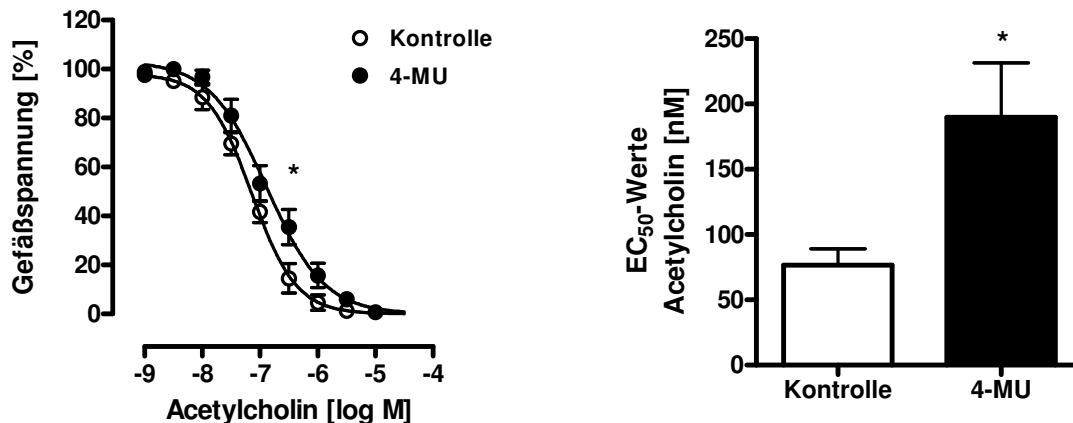
Um diese Vermutung zu überprüfen wurden Organbadversuche mit isolierten Aortenringen der Mäuse durchgeführt.

Nach einer Äquillibrierungsphase in dem Organbad, wurden die Aortenringe zweimal mit 80 mM KCl depolarisiert und somit eine Maximalkontraktion ausgelöst. Durch die Kontraktion wurde die Funktionalität der Gefäße kontrolliert und die glatten Muskelzellen der Aorta konnten für die späteren Versuche äquillibriert werden. Sowohl bei der ersten als auch bei der zweiten Kontraktion mit KCl zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den unbehandelten und 4-MU behandelten Tieren (Abbildung 3-25). Folglich konnte davon ausgegangen werden, dass die Gefäße beider Gruppen intakt und somit keine Einschränkung der Funktionalität durch die Präparation der Aortenringe davongetragen hatten.



**Abbildung 3-25** Um die Funktionalität der Aortenringe im Organbad nach ihrer Präparation zu untersuchen wurden sie mit KCl depolarisiert um eine Maximalkontraktion zu erzeugen. Man erkennt bei der ersten, als auch bei der zweiten Kontraktion keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Die Kontrollen erreichen eine Kontraktion von  $6,99 \pm 0,61$  mN und die 4-MU behandelten Tiere erreichen eine Kontraktion von  $7,58 \pm 0,45$  mN. Die Werte der zweiten Kontraktion liegen mit  $8,09 \pm 0,55$  mN für die Kontrollen und  $8,86 \pm 0,43$  mN für die 4-MU behandelten Tiere minimal höher als bei der ersten Kontraktion. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 7-8$  Tiere pro Gruppe.

Als nächstes wurde die Endothel-abhängige Relaxation der Aortenringe durch Acetylcholin untersucht. Nach einer Vorkontraktion mit 200 nM Phenylephrin zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Relaxation der Aortenringe zwischen den beiden Versuchsgruppen. Die 4-MU Behandlung führte zu einer Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve nach rechts und einer Verdopplung der  $EC_{50}$ -Konzentration für Acetylcholin nach 4-MU Behandlung (Abbildung 3-26).

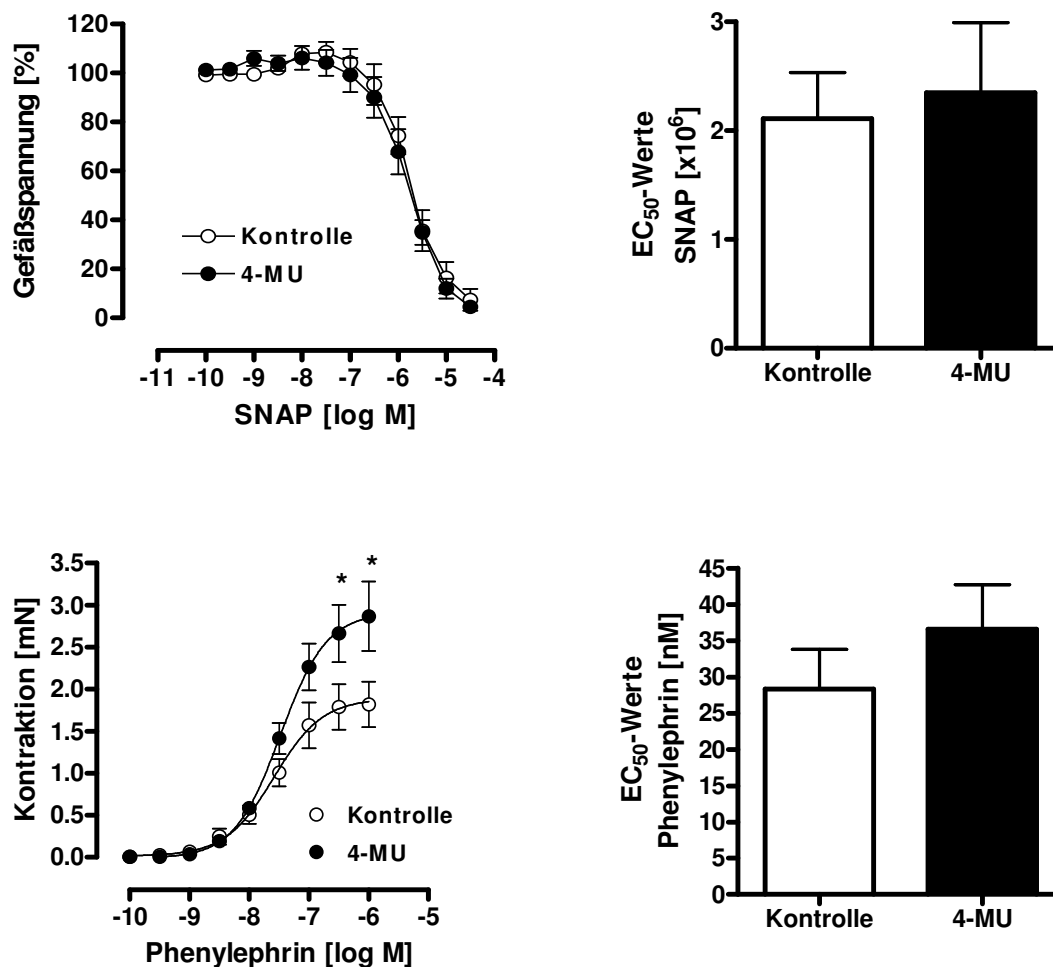


**Abbildung 3-26** An isolierten Aortenringen in einem Organbadversuch wurde die Acetylcholin-abhängige Relaxation nach Vorkontraktion mit 200 nM Phenylephrin untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Verschiebung aus der Konzentrations-Wirkungskurve nach rechts und signifikant erhöhte  $EC_{50}$ -Werte für Acetylcholin unter 4-MU Behandlung ( $189,8 \pm 41,7$  nM) im Vergleich zu der Kontrolle ( $76,9 \pm 12,4$  nM). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 7-8$  Tiere pro Gruppe; \*,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

Um die Sensitivität der isolierten Aortenringe gegenüber exogenem NO zu überprüfen wurde SNAP dem Medium des Organbads nach einer Vorkontraktion mit 10  $\mu$ M Phenylephrin zugefügt. Die Gefäßrelaxation durch den exogenen NO-Donor SNAP wurde durch 4-MU nicht beeinflusst (Abbildung 3-27). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Sensitivität der vaskulären glatten Muskulatur gegenüber Stickstoffmonoxid durch die Behandlung mit 4-MU nicht beeinflusst wurde.

Des Weiteren wurde die Kontraktion der isolierten Aortenringe als Antwort auf den  $\alpha$ -Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin untersucht und eine Konzentrations-Wirkungskurve aufgezeichnet. Hier zeigte sich eine Steigerung in der maximalen Kontraktilität unter 4-MU Behandlung (Abbildung 3-27).





**Abbildung 3-27** An isolierten Aortenringen in einem Organbadversuch wurde die Reaktion auf exogen zugeführtes NO durch den NO-Donor SNAP (oben) und die Kontraktion unter Zugabe von Phenylephrin (unten) untersucht. Die Gefäßrelaxation durch SNAP zeigte zwischen den beiden Untersuchungsgruppen keinen Unterschied. Die Dosis-Wirkungskurve und die EC<sub>50</sub>-Werte zeigten keine Veränderung durch 4-MU. Bei der Behandlung mit Phenylephrin zeigte sich eine Erhöhung der maximalen Kontraktion unter 4-MU Behandlung. Die EC<sub>50</sub>-Werte für Phenylephrin blieben jedoch gleich zwischen den beiden Behandlungsgruppen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 7-8 Tiere pro Gruppe; \*, p < 0.05 vs. Kontrolle.

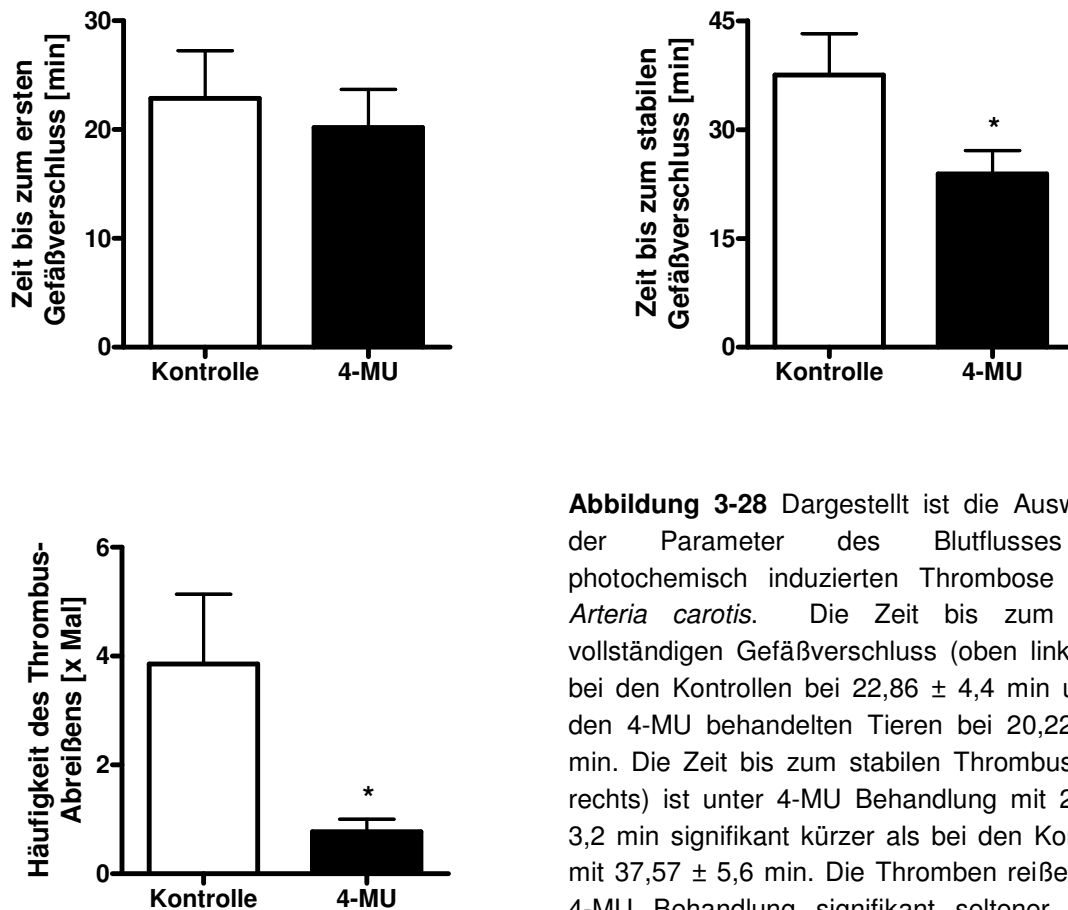
Es wurde festgestellt, dass 4-Methylumbelliferon die Acetylcholin-induzierte Endothel-abhängige Vasodilatation negativ beeinflusst. Ebenso konnte gezeigt werden, dass 4-MU die maximale Kontraktilität der Aortenringe unter Zugabe von Phenylephrin steigert. Die relaxierende Wirkung des exogen NO-Donors SNAP wurde dagegen durch 4-MU nicht beeinflusst.

### 3.8 4-MU hat eine pro-thrombotische Wirkung

#### 3.8.1 4-MU steigert die Thromboseneigung

Die Blutdruckerhöhung durch die Behandlung mit 4-MU und die Schädigung der Endothelfunktion konnten in den vorangegangenen Versuchen nachgewiesen werden. Eine Schädigung des Endothels geht mit einem verstärkten Kontakt prokoagulatorischer Proteine der Gefäßwand mit dem Blutstrom einher. Da durch diese Gefäßveränderung auch die Thrombusbildung begünstigt werden könnte, wurde in einem Modell der photochemisch induzierten Verletzung der *Arteria carotis* die thrombotische Antwort der ApoE-defizienten Mäuse untersucht. In diesem Modell der induzierten Thrombose wird der Farbstoff Rose Bengal injiziert und durch einen Grünlicht-Laser aktiviert, das führt durch oxidativen Stress zu einer lokalen Schädigung des Endothels. Gemessen und ausgewertet wird in diesem Modell der distal zur Läsion gemessene Blutfluss, der infolge der ausgelösten Thrombusformation abnimmt.

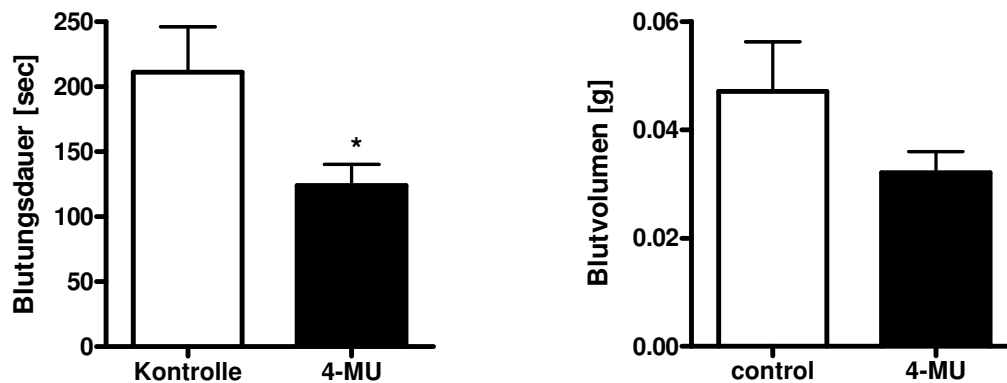
Die Zeit bis zum ersten vollständigen Gefäßverschluss wurde durch die Fütterung der Tiere mit 4-MU nicht beeinflusst (Abbildung 3-28). Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ergaben sich hinsichtlich des Auftretens zyklischer Flussveränderungen, also der Häufigkeit der spontanen Thrombusablösung mit Wiederherstellung der Perfusion. In den Kontrolltieren lösten sich im Schnitt die ersten vier Thromben spontan von der Gefäßwand, während es in den mit 4-MU behandelten Tieren im Schnitt nur zu einer einzigen Reperfusion bis zur Ausbildung einer stabilen Okklusion kam (Abbildung 3-28). Ein signifikanter Unterschied zeigte sich dementsprechend auch in der Zeit bis zu einer stabilen Okklusion der Gefäße. In den unbehandelten Kontrollen trat durchschnittlich nach  $34 \pm 5,4$  Minuten ein irreversibler thrombotischer Verschluss ein, in den 4-MU behandelten kam es bereits nach  $24 \pm 3,4$  Minuten zu einer stabilen Okklusion (Abbildung 3-28).



**Abbildung 3-28** Dargestellt ist die Auswertung der Parameter des Blutflusses der photochemisch induzierten Thrombose in der *Arteria carotis*. Die Zeit bis zum ersten vollständigen Gefäßverschluss (oben links) liegt bei den Kontrollen bei  $22,86 \pm 4,4$  min und bei den 4-MU behandelten Tieren bei  $20,22 \pm 3,4$  min. Die Zeit bis zum stabilen Thrombus (oben rechts) ist unter 4-MU Behandlung mit  $23,89 \pm 3,2$  min signifikant kürzer als bei den Kontrollen mit  $37,57 \pm 5,6$  min. Die Thromben reißen unter 4-MU Behandlung signifikant seltener ab als unter den Kontrollbedingungen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 7-9$  Tiere pro Gruppe; \*,  $p < 0.05$  vs. Kontrolle.

### 3.8.2 4-MU reduziert die Blutungszeit

Um den Einfluss der Endothelschädigung und der verstärkten Thromboseneigung auf den Wundverschluss zu untersuchen wurde die Blutungsdauer nach einer definierten Verletzung gemessen. Zur Bestimmung der Blutungsdauer und des Blutvolumens wurde die „tail cut bleeding“ Methode verwendet. Durch die Behandlung mit 4-MU ist die Blutungsdauer signifikant um 40 % im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren verkürzt. Mit der verkürzten Blutungszeit unter 4-MU Behandlung ging auch ein geringerer Blutverlust (0,047 g vs. 0,032 g, Kontrolle vs. 4-MU) einher. Der Unterschied im Gesamtblutverlust zwischen den beiden Behandlungsgruppen war nicht signifikant (Abbildung 3-29).



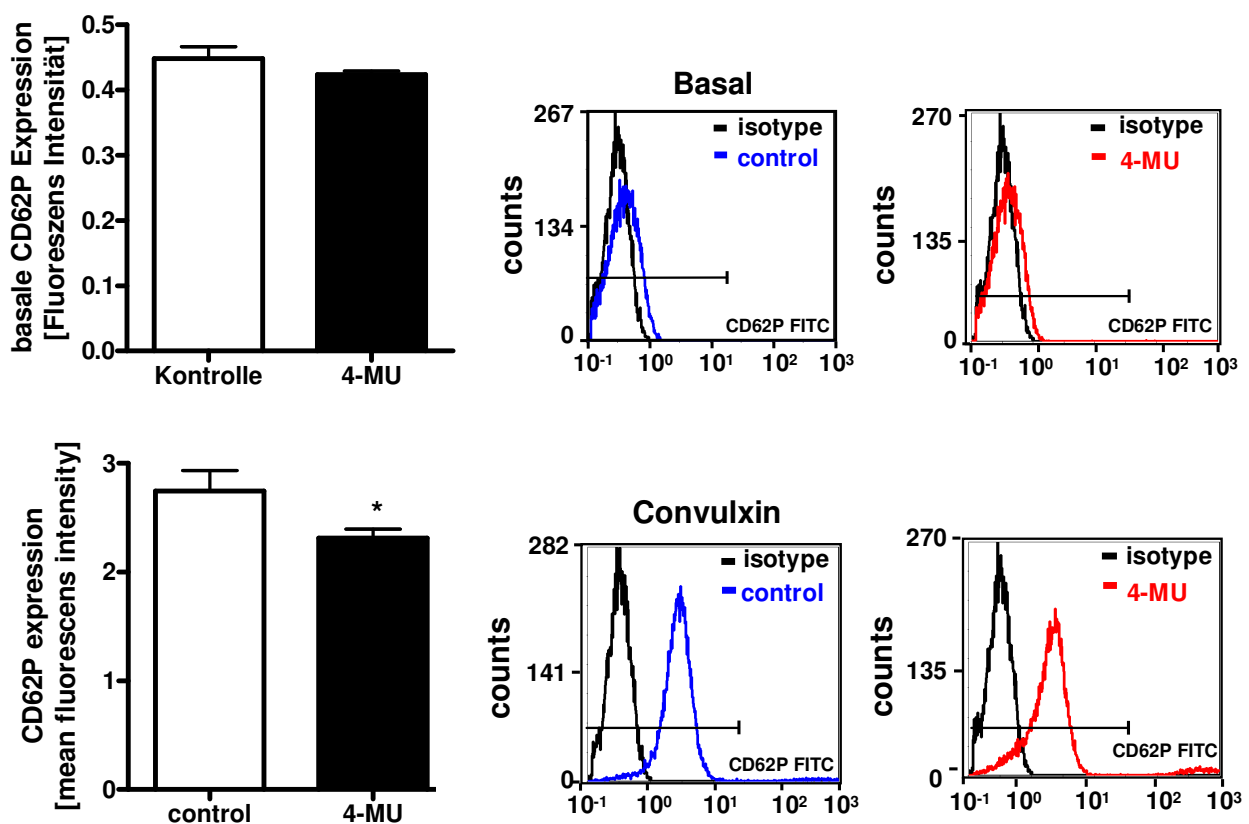
**Abbildung 3-29** Mittels der „tail cut bleeding“ Methode wurde die Blutungszeit und das Blutvolumen nach induzierter Verletzung gemessen. Auf der linken Seite ist die Blutungsdauer in Sekunden dargestellt, welche mit  $123,9 \pm 16$  sec unter 4-MU Behandlung im Vergleich zu den  $211,1 \pm 35$  sec bei Kontrolltieren signifikant verkürzt war. Das mit der Blutungszeit korrelierte Blutvolumen ist auf der rechten Seite dargestellt. Auch hier zeigt sich eine deutliche, jedoch nicht signifikante Reduktion des Blutvolumens unter 4-MU Behandlung im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 8$  Tiere pro Gruppe; \*,  $p < 0.05$  vs. Kontrolle.

Diese Daten belegen eindeutig, dass die Behandlung der Tiere mit 4-Methylumbelliferon zu einer verstärkten Thrombusneigung und zu einer erhöhten Thrombusstabilität führt. Als mögliche Ursachen der pro-thrombotischen Wirkung des 4-Methylumbelliferon kommen eine erhöhte Aktivität der Blutplättchen, eine erhöhte Thrombinaktivität oder eine stärker thrombogene Gefäßwand (EZM) in Frage.

### 3.8.3 Analyse der Plättchenaktivierung

Um die möglichen Ursachen der pro-thrombotischen Wirkung von 4-MU zu untersuchen wurde der Aktivierungszustand der Thrombozyten anhand der CD62P Oberflächenexpression bestimmt. CD62P (P-Selektin) ist ein Zell-Adhäsions Molekül, das unter anderem in Thrombozyten zu finden ist. In ruhenden Plättchen ist P-Selektin vollständig in den  $\alpha$ -Granula gespeichert und nicht an der Oberfläche detektierbar. Eine Plättchenaktivierung verursacht eine schnelle Freisetzung aus den  $\alpha$ -Granula und die Präsentation an der Thrombozytenoberfläche. Das Ausmaß der Oberflächenexpression von P-Selektin korreliert dabei direkt mit dem Aktivierungszustand der Plättchen. Durch Analyse der CD62P-Oberflächenexpression mittels FACS konnte nachgewiesen werden, dass die basale Aktivität der

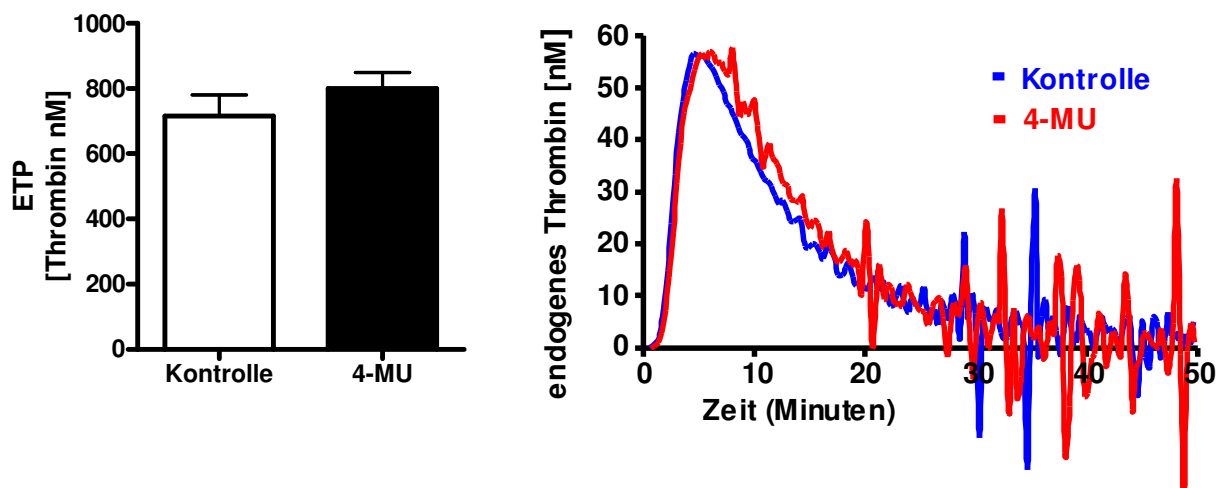
Plättchen durch die Behandlung mit 4-MU nicht beeinflusst wurde (Abbildung 3-30). Nachdem es keine Unterschiede in der basalen Aktivität der Plättchen gab, wurde durch Stimulation mit Convulxin untersucht, ob sich die maximale Aktivierbarkeit der Plättchen unter Behandlung mit 4-MU verändert. Convulxin wird aus dem Gift einer tropischen Klapperschlange (*Crotalus durissus terrificus*) isoliert und führt zu Plättchenaktivierung. Die maximale Aktivierbarkeit der Plättchen war unter 4-MU Behandlung im Vergleich zu den Kontrollen signifikant gesenkt (Abbildung 3-30). Durch diese Befunde kann eine systemische Plättchenaktivierung als Ursache für die pro-thrombotischen Wirkung von 4-MU ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3-30** Die Plättchenaktivierung wurde *ex vivo* mittels FACS Analyse der CD62P Expression in plättchenreichem Plasma bestimmt. In der oberen Reihe ist die basale Aktivierung der Plättchen zu erkennen, die sich mit 0,44 für die Kontrollen und 0,42 für die 4-MU behandelten Tiere nicht unterscheidet. Auf der rechten Seite sind repräsentative graphische Darstellungen der FACS Messungen gezeigt, Mitte = Kontrolle, rechts = 4-MU. In der unteren Zeile ist die Aktivierung der Plättchen nach Convulxin Stimulation dargestellt, aus der hervorgeht, dass die maximale CD62P-Expression der Plättchen unter Kontrollbedingungen bei  $2,74 \pm 0,18$  liegt und unter 4-MU Behandlung signifikant auf  $2,31 \pm 0,08$  sinkt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 6-7$  Tiere pro Gruppe; \*,  $p < 0.05$  vs. Kontrolle.

### 3.8.4 Endogenes Thrombinpotential

Als nächstes wurde die Thrombinaktivität als endogenes Thrombinpotential (ETP) des Plasmas bestimmt. Durch das ETP können Verschiebungen in der Synthese und Aktivität der Gerinnungsfaktoren (II, VII, IX, X) und ihrer Substrate nachgewiesen werden. Eine verringerte Synthese der Gerinnungsfaktoren, wie sie z.B. durch orale Antikoagulantien vom Cumarintyp erreicht werden kann, führt zu einer später einsetzenden explosiven Thrombinbildung mit einer verringerten maximalen Thrombinkonzentration und einer verringerten Fläche unter der Thrombinbildungs-Kurve. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit 4-Methylumbelliferon nicht zu einer signifikanten Veränderung der Thrombinaktivität führt (Abbildung 3-31).

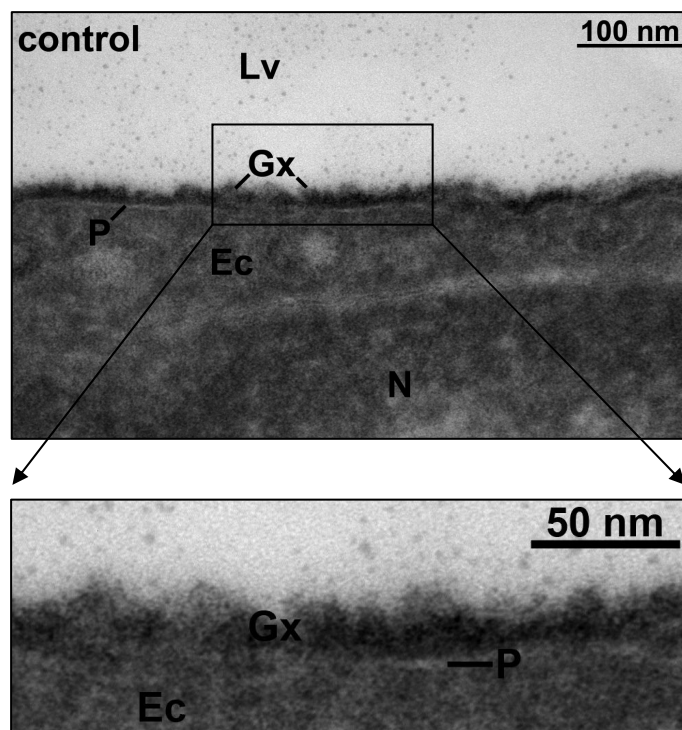


**Abbildung 3-31** Die Aktivierung des endogenen Thrombinpotentials (ETP) wurde *ex vivo* mittels FACS Analyse in plättchenarmen Plasma bestimmt. Das Plasma der unbehandelten Tiere zeigt eine Konzentration an endogenem Thrombin von  $716 \pm 64$  nm, bei den 4-MU behandelten Tieren steigt die Konzentration auf  $800 \pm 48$  nm an. Dieser leichte Anstieg des ETP unter 4-MU ist nicht signifikant. Auf der rechten Seite der Abbildung ist eine repräsentative Kurve der Thrombinbildung über die Zeit für die Kontrollen (blau) und die 4-MU Behandlung (rot) gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 6-7$  Tiere pro Gruppe.

### 3.9 4-MU reduziert die endotheliale Glykokalyx

Durch den Hyaluronsäuresynthase-Inhibitor 4-MU kommt es zu einer Reihe von vaskulären Effekten, einschließlich vermehrter Atherosklerose mit einem gesteigerten Gehalt an Makrophagen, einem gesteigerten Blutdruck und schlechterer Endothelfunktion, welche mit einem gesteigerten Thromboserisiko einhergehen. Diese vaskulären Effekte könnten durch eine Beschädigung oder Verminderung der Glykokalyx hervorgerufen werden. Hyaluronsäure ist neben Heparansulfat der wichtigste Kohlenhydrat-Bestandteil der Glykokalyx. Frühere Studien zeigten einen eindeutig protektiven Effekt der Glykokalyx auf die Endothelfunktion.

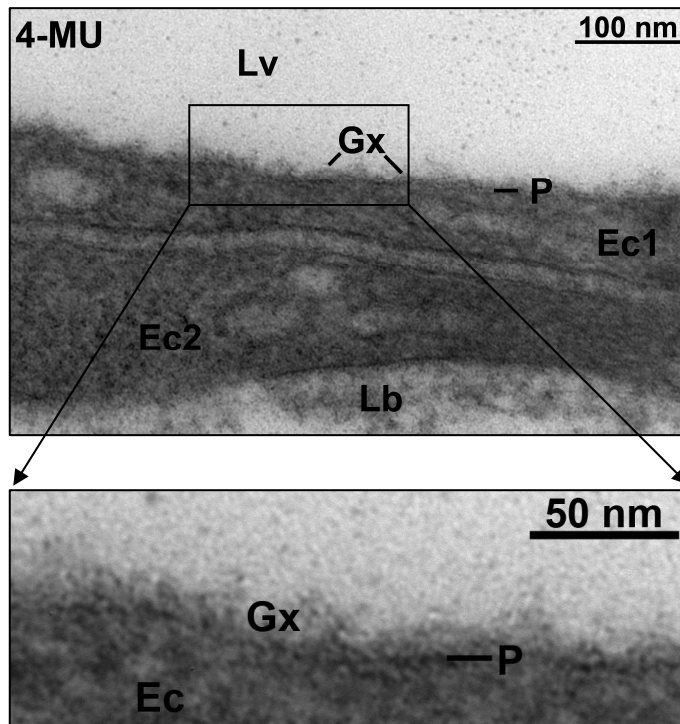
Um die endotheliale Glykokalyx mittels Elektronenmikroskopie darstellen zu können, wurde Rutheniumrot in einer Fixierlösung während der Perfusion verwendet. Der Zustand der Glykokalyx wurde an den Kapillaren des Herzens untersucht und konnte auf der apikalen Oberfläche der Endothelzellen in den Kontrolltieren eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 3-32).



**Abbildung 3-32** Elektronenmikroskopische Darstellung der endothelialen Glykokalyx 15 Wochen alter ApoE-defizienter Mäuse, denen Kontrollfutter zugeteilt wurde. Die Glykokalyx (Gx) ist als durchgängiger, dunkler Saum auf der Plasmamembran (P) der Endothelzellen (Ec) zu sehen. Lv = *Lumen ventriculus*, N = *Nucleus*. Die untere Abbildung zeigt einen Auszug der Glykokalyx aus dem oberen Übersichtsbild.

Die Glykokalyx präsentierte sich in den unbehandelten Kontrolltieren als ein durchgängiger, dunkler Saum, der ausgehend von der Membran der Endothelzellen ins Gefäßlumen hineinreichte. Die mit 4-Methylumbelliferon behandelten Tiere

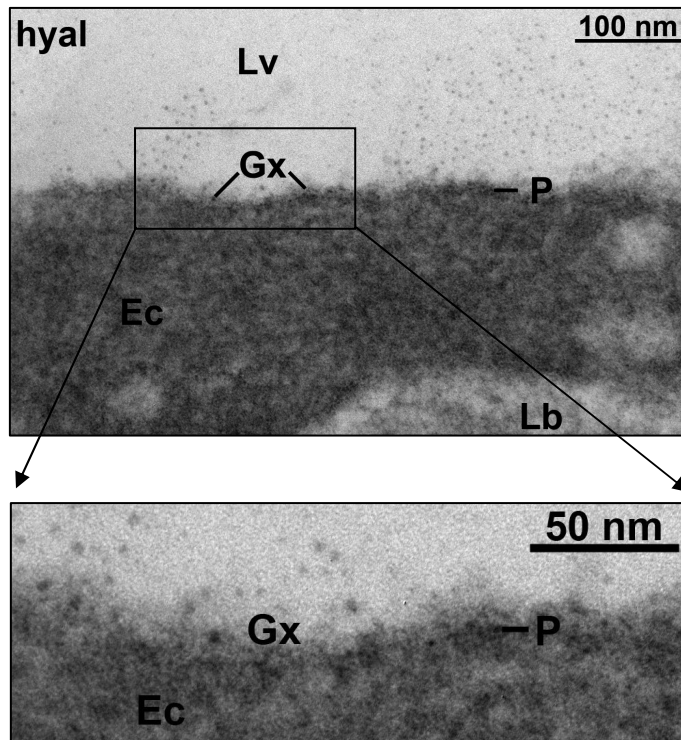
zeigten tatsächlich eine Glykokalyx, welche im Vergleich zu den Kontrollen weniger dicht und dünner war (Abbildung 3-33).



**Abbildung 3-33** Elektronenmikroskopische Darstellung der endothelialen Glykokalyx ApoE-defizienter Mäuse, die mit dem Hyaluronsäuresynthese-Inhibitor 4-Methylumbelliferon behandelt wurden. Die Glykokalyx (Gx) ist als dünner nicht durchgängiger Saum auf der Plasmamembran (P) der Endothelzellen (Ec) zu sehen. Lv = *Lumen vascularis*, Lb = *Lamina basalis*. Die untere Abbildung zeigt eine Vergrößerung der Glykokalyx aus dem oberen Übersichtsbild.

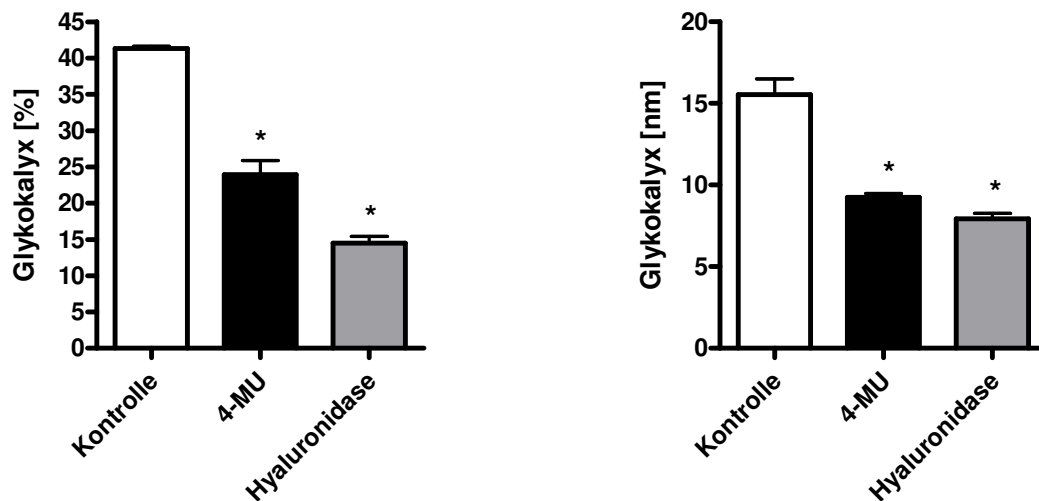
Um nachzuweisen, dass es sich bei der gezeigten Struktur tatsächlich um die überwiegend aus Hyaluronsäure bestehende Glykokalyx handelt, wurden die Tiere vor der Rutheniumrot enthaltenden Fixationsperfusion mit Hyaluronidase perfundiert. Die Hyaluronidase ist ein Enzym, welches Hyaluronsäure abbaut und demzufolge das Netzwerk der Glykokalyx stark vermindert. Die Glykokalyx in den Kapillaren des Herzens war nach der Behandlung mit Hyaluronidase nur noch rudimentär vorhanden. Der überwiegende Teil der Reste der Glykokalyx bestand aus dünnen und häufig unterbrochenen Saumstückchen. Ein durchgängiger Saum wie in den unbehandelten Tieren konnte nach der Behandlung mit Hyaluronidase nicht mehr gezeigt werden (Abbildung 3-34).





**Abbildung 3-34** Elektronenmikroskopische Darstellung der endothelialen Glykokalyx ApoE-defizienter Mäuse, die mit Hyaluronidase, einem Enzym, das die Hyaluronsäure abbaut, behandelt wurden. Die Glykokalyx (Gx) ist nur noch als ganz dünner und unregelmäßiger Saum auf der Plasmamembran (P) der Endothelzellen (Ec) zu sehen. Lv = *Lumen vascularis*, Lb = *Lamina basalis*. Die untere Abbildung zeigt eine Vergrößerung der Glykokalyx aus dem oberen Übersichtsbild.

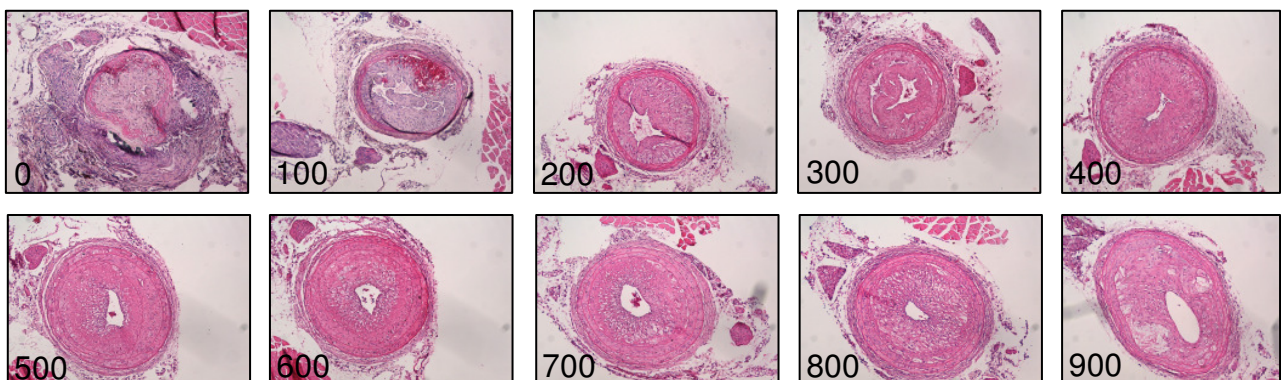
Um die endotheliale Glykokalyx unter Einfluss der verschiedenen Behandlungen zu quantifizieren wurde die Größe der Glykokalyx als Prozent einer definierten Fläche (200 x 300 Pixel), die mit der unteren Seite auf die endothelialen Plasmamembran gelegt wurde, bestimmt. Die Dicke der Glykokalyx beginnend an der äußeren Membran der Endothelzellen bis zu ihrem Ende im Gefäßlumen wurde ebenfalls gemessen. Die Behandlung mit 4-MU führte zu einer signifikanten Reduktion der Fläche der Glykokalyx um fast 50 % im Vergleich zur Glykokalyx der unbehandelten Tiere. Durch die Vorbehandlung mit Hyaluronidase wurde die Fläche der Glykokalyx im Vergleich zur Kontrolle um über 60 % reduziert. Die morphometrische Auswertung der Dicke der Glykokalyx spiegelte das Ergebnis der Glykokalyx-Flächenmessung wieder. Auch hier zeigte sich eine Reduktion der Glykokalyx unter 4-MU Behandlung um fast 50 % im Vergleich zur Kontrolle. Die mit Hyaluronidase perfundierten Tiere zeigten in der Dicke der Glykokalyx im Vergleich zu den Kontrollen ebenfalls eine Reduktion von 50 %. Die Dicke der Glykokalyx der Hyaluronidase perfundierten Tiere und die der 4-Methylumbelliferon behandelten Tiere unterschied sich dementsprechend kaum (Abbildung 3-35).



**Abbildung 3-35** Morphometrische Auswertung der endothelialen Glykokalyx. Die linke Grafik zeigt den prozentualen Anteil der Glykokalyx an einer definierten Fläche von 200 x 300 Pixel. Die Kontrollen erreichen einen Anteil von  $41,33 \pm 0,31$  %, die 4-MU behandelten Tiere  $23,96 \pm 1,9$  % und nach der Perfusion mit Hyaluronidase bedeckt die Glykokalyx nur noch eine Fläche von  $14,49 \pm 0,94$  %. Die Dicke der Glykokalyx (rechts) ist unter 4-MU und Hyaluronidase Behandlung ebenfalls im Vergleich zu der Kontrolle signifikant reduziert. Die Glykokalyx der Kontrollen wies eine durchschnittliche Dicke von  $15,54 \pm 0,37$  nm auf, die 4-MU Behandlung reduzierte diese auf  $9,24 \pm 0,24$  nm. Die Hyaluronidase Perfusion reduzierte die Dicke der Glykokalyx auf  $7,91 \pm 0,34$  nm. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$  Tiere pro Gruppe; \*,  $p < 0,001$  vs. Kontrolle.

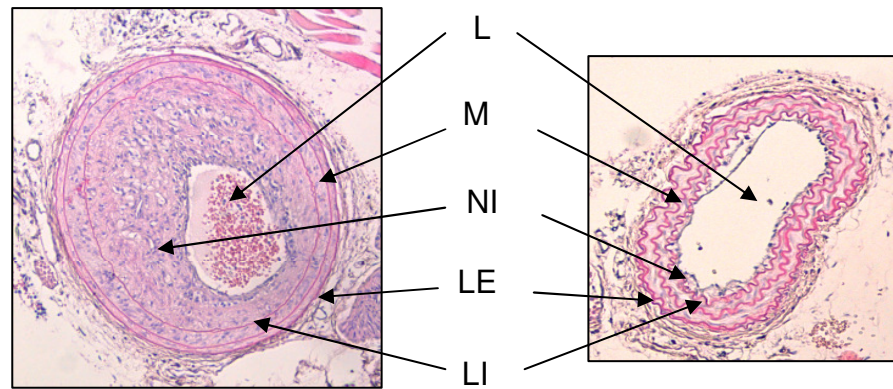
### 3.10 4-MU hat keinen Einfluss auf die Neointima-Hyperplasie

Die Studien von Harmon *et al.*, zeigten, dass eine Neointima-Hyperplasie in wenigen Wochen durch eine Ligatur der *Arteria carotis communis* bei Mäusen erzeugt werden kann<sup>157</sup>. Diese kurzfristig induzierte Neointima besteht überwiegend aus vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC). Um die Neointima-Hyperplasie zu erzeugen wurde eine Ligatur an der *Arteria carotis communis* wie von Lindner *et al.*, beschrieben durchgeführt. Die *A. carotis* wurde nachfolgend histologisch und morphometrisch untersucht. Um die Morphometrie der Neointima zu untersuchen, wurden die Schnittpräparate der *A. carotis* über eine Länge von 1000 µm alle 50 µm einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen (Abbildung 3-36). Der nach einer vierwöchigen Ligatur dargestellte Verlauf der Neointima-Hyperplasie beginnt an der Stelle des Ligaturknotens. Der erste für die Auswertungen verwendete Schnitt ist unmittelbar hinter dem Ligaturknoten. Sobald die Ligaturfäden die *A. carotis* nicht mehr deformieren wird der Schnitt aufgenommen und für morphologische und histologische Untersuchungen verwendet.



**Abbildung 3-36** Exemplarische Darstellung des Verlaufes der Neointima-Hyperplasie der *Arteria carotis communis* vier Wochen nach Ligatur bei 14 Wochen alten ApoE-defizienten Mäusen.

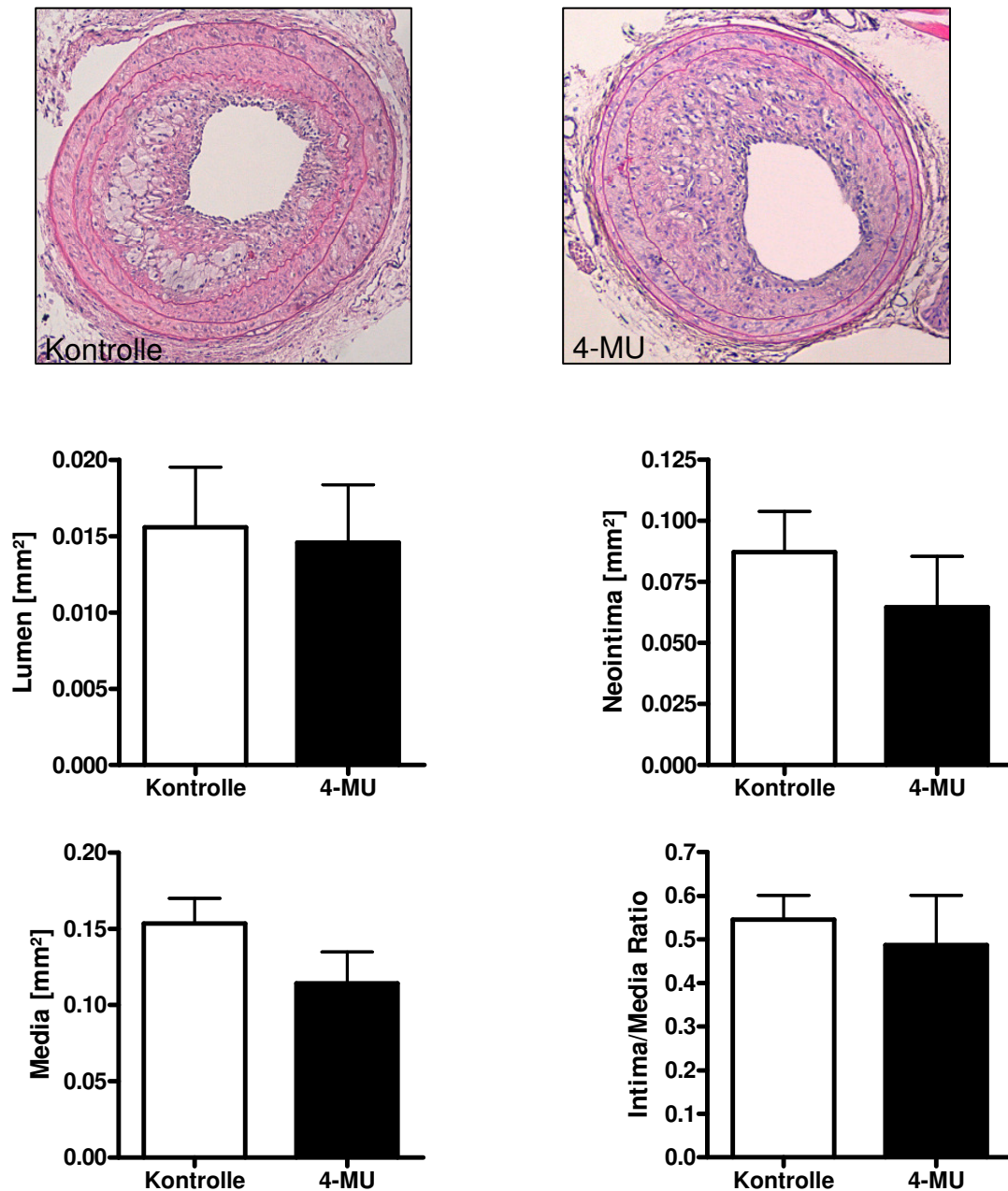
In der nachfolgenden Abbildung 3-37 sind exemplarisch Querschnitte durch die linke und rechte *A. carotis* dargestellt. Da für die Erzeugung der Neointimahyperplasie nur die *A. carotis communis sinister* ligiert wurde, zeigt die *A. carotis dextra* keine Anzeichen einer Neointima-Hyperplasie. In einigen Abschnitten der *A. carotis communis* konnte kein Lumen mehr beobachtet werden, da das Gefäß vollständig von einer Neointima ausgekleidet war.



**Abbildung 3-37** Exemplarische Darstellung der Neointimahyperplasie der *Arteria carotis communis sinister* (links) und *dextra* (rechts) nach vierwöchiger Ligatur bei 14 Wochen alten ApoE-defizienten Mäusen. L = Lumen, M = Media, NI = Neointima, LE = *Lamina elastica externa*, LI = *Lamina elastica interna*

Nach einer Ligaturdauer von vier Wochen konnte somit eine deutlich ausgeprägte, VSMC-reiche Hyperplasie der Neointima in der *A. carotis* der unbehandelten Tiere festgestellt werden. Auffällig war, dass der Hyaluronsäure-Inhibitor 4-MU in diesem Modell keine Effekte auf die Neointimahyperplasie hat, wie die morphologischen Untersuchungen klar belegen.

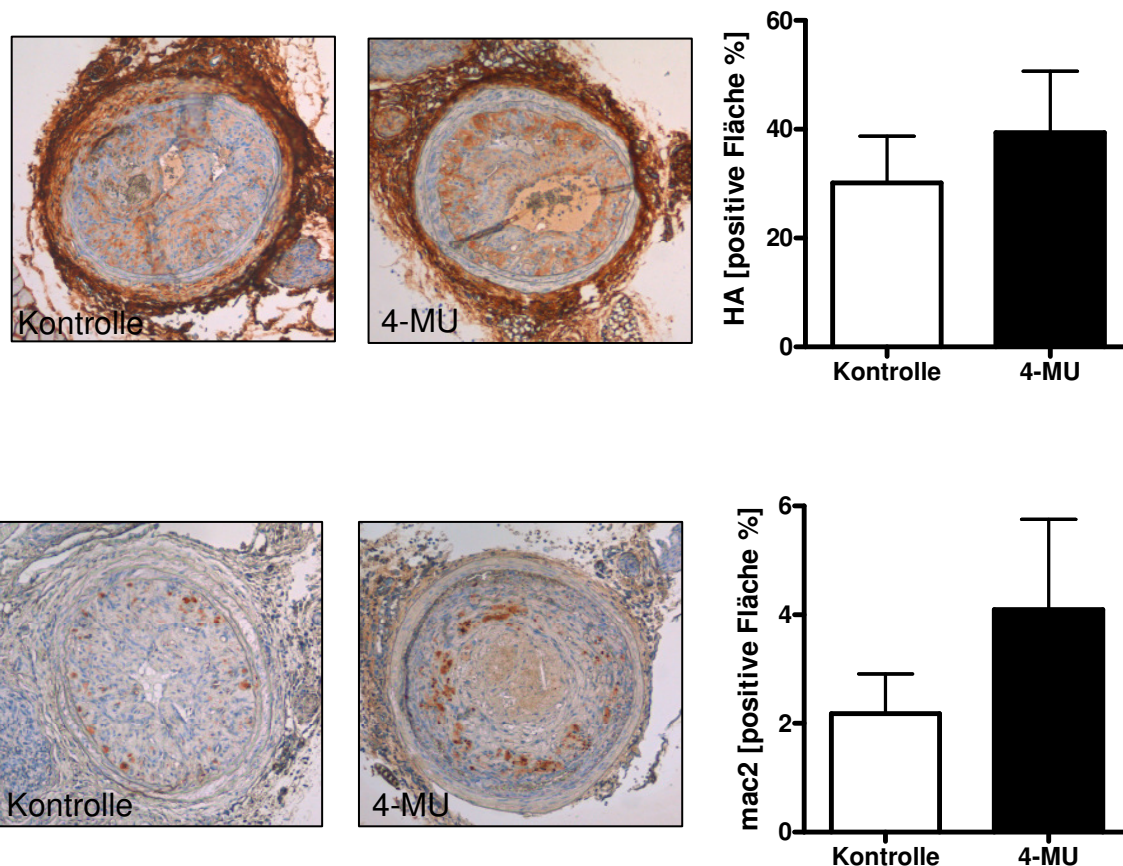
Die durch Ligatur erzeugte Neointima-Hyperplasie wurde in den 4-MU behandelten Tieren um 25 % im Vergleich zu den Kontrollen gesenkt. Ein ähnliches Ergebnis ergab die Auswertung der Media-Fläche. Auch diese wurde durch die Behandlung mit 4-MU um 25 % im Vergleich zu den Kontrollen verringert. Das Verhältnis der Neointima zur Media war um 11 % gesenkt unter 4-MU Behandlung (Abbildung 3-38). Somit konnte nachgewiesen werden, dass die verstärkenden Effekte von 4-MU nicht bei vaskulären Läsionen auftreten, die überwiegend durch Migration und Proliferation von VSMCs entstehen.



**Abbildung 3-38** Morphometrische Auswertung der Ligatur-induzierten Neointima-Hyperplasie der *A. carotis* nach vier Wochen von unbehandelten und 4-MU behandelten Tieren. Die beiden Bilder (oben) zeigen repräsentativ eine H&E Färbung der *A. carotis*, die hinsichtlich der Morphologie sehr ähnlich sind. Das Lumen der *A. carotis* (Mitte, links) unterscheidet sich nur minimal, mit 0,015 mm<sup>2</sup> bei den unbehandelten und 0,014 mm<sup>2</sup> bei den behandelten Tieren. Die Neointima zeigt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Kontrolle: 0,087mm<sup>2</sup>; 4-MU 0,064 mm<sup>2</sup>). Dieser Trend wird in der Media fortgeführt, wo die unbehandelten Tiere durchschnittlich 0,153 mm<sup>2</sup> und die 4-MU behandelten Tiere 0,114 mm<sup>2</sup> erreichen. Die Ratio der Intima zur Media ist mit 0,54 für die Kontrollen und 0,48 für die 4-MU behandelten Tiere fast gleich. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 5 Tiere pro Gruppe.



Histologisch wurde an den Schnitten der ligierten *A. carotis* untersucht, welchen Einfluss 4-MU auf den Hyaluronsäure-Gehalt und die Makrophagen-Akkumulation in der Neointima-Hyperplasie hat. Durch die Färbungen konnte gezeigt werden, dass 4-MU keinen signifikanten Einfluss auf den Hyaluronsäure-Gehalt und den Makrophagengehalt der Neointimahyperplasie hat (Abbildung 3-39).



**Abbildung 3-39** Darstellung einer ligierten *A. carotis* die für Hyaluronsäure (oben) und für Makrophagen (unten) gefärbt wurden. Die braun gefärbten Bereiche in der Neointima zeigen die positive Färbung der jeweiligen Antikörper an. Die digitale Bildanalyse der einzelnen Färbungen befindet sich rechts von den dazugehörigen Photographien. Es zeigt sich in beiden Färbungen keine Veränderung unter der 4-Methylumbelliferon Behandlung im Vergleich zur Kontrolle. Der Hyaluronsäure-Gehalt lag bei den Kontrollen bei  $30,17 \pm 8,6$  % und bei den 4-MU behandelten Tieren bei  $39,39 \pm 11,27$  %. Der Gehalt an Makrophagen lag bei den 4-MU Tieren bei  $4,09 \pm 1,66$  % und bei den Kontrollen bei  $2,18 \pm 0,72$  %. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 5$  Tiere pro Gruppe.

## 4 Diskussion

Die Hyaluronsäuresynthasen und die Hyaluronsäure-degradierenden Enzyme sind potentielle Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Arzneimittel in der Tumorthapie<sup>62, 158</sup> und möglicherweise auch bei kardiovaskulären Erkrankungen<sup>159</sup>. Die systemische Evaluation der Funktionen der einzelnen HAS-Isoformen *in vivo* wird durch das Fehlen von geeigneten *knock-out* Modellen wesentlich behindert. Ein genetischer *knock-out* der HAS2 bei Mäusen ist embryonal letal, da es zu einer Fehlentwicklung des Gefäßsystems und des Herzes kommt. Ein genetischer *knock-out* der HAS1 und HAS3 wirken sich nicht auf die embryonale Entwicklung des Herzkreislaufsystems aus und die Tiere sind lebensfähig<sup>160</sup>. Allerdings sind die HAS1- und HAS3-defizienten Mäuse nicht genau charakterisiert worden und stehen der Forschungsgemeinschaft nicht zur Verfügung. Die Inhibition der HA-Synthese durch 4-Methylumbelliferon erwies sich in den letzten Jahren in diversen *in vitro* Studien an Tumorzelllinien als effektiv. *In vivo* wurde 4-Methylumbelliferon zum ersten Mal im Jahre 2005 in murinen Tumormodellen eingesetzt<sup>143, 161</sup>. Im Gegensatz zu der inzwischen beachtlichen Anzahl an *in vitro* Studien und der geringeren Anzahl an *in vivo* Studien im Bereich der Tumorforschung, gibt es keine Informationen über die Effekte einer Inhibition der HA-Synthese auf das Gefäßsystem.

Eine zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit den Auswirkungen einer Inhibition der Hyaluronsäuresynthese durch 4-Methylumbelliferon auf das kardiovaskuläre System in einem Mausmodell der Atherosklerose. Da die Hyaluronsäure durch ihr Vorkommen sowohl in der EZM atherosklerotischer Läsionen als auch in der gefäßauskleidenden Glykokalyx eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Atherogenese spielt, wurden im ersten Teil der Arbeit die atherosklerotischen Plaques näher untersucht, während im zweiten Teil der Arbeit die endotheliale Glykokalyx im Fokus stand.

## 4.1 Einfluss von Hyaluronsäure auf die Atherosklerose

In humanen atherosklerotischen und restenotischen Läsionen konnte eine Verbindung zwischen Bereichen hoher proliferativer Aktivität und gesteigertem Vorkommen von Hyaluronsäure gezeigt werden<sup>72</sup>. Die Akkumulation der Hyaluronsäure in atherosklerotischen Plaques ist zeitlich nicht an die Progression der Atherosklerose gebunden. Eine HA-Akkumulation wurde sowohl in frühen als auch in späten Stadien der atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen. In den frühen Stadien der Läsionen ist die Hyaluronsäure überwiegend mit proliferierenden vaskulären glatten Muskelzellen assoziiert. Neben der Hyaluronsäure bestimmt die Anwesenheit Hyaluronsäure-bindender Proteine, wie z.B. Versikan, TSG-6, CD44 oder RHAMM die Funktion der Hyaluronsäurematrix<sup>106</sup>. Zellteilungsanregende Proteine stimulieren die Expression der Hyaluronsäuresynthasen der VSMC, was zu einer Ausbildung großer perizellulärer HA-Netzwerke führt<sup>162</sup>. *In vitro* Untersuchungen an vaskulären glatten Muskelzellen haben gezeigt, dass die HA-Synthese zu einer migratorischen und proliferativen Antwort von VSMC beiträgt<sup>73</sup>. Besonders die PDGF-BB-induzierte Proliferation steht in Verbindung mit der Induktion einer Hyaluronsäure- und Versikan-reichen perizellulären Matrix<sup>70, 163</sup>. Weitere Studien konnten zeigen, dass die Proliferation und Migration vaskulärer glatter Muskelzellen während der Neointimahyperplasie abnimmt, wenn die Hyaluronsäure-Rezeptoren CD44 und RHAMM blockiert werden<sup>99, 164</sup>. Daher wird angenommen, dass die interstitielle Hyaluronsäurematrix die proliferativen und migratorischen Antworten während der Neointimahyperplasie begünstigt. Des Weiteren wird angenommen, dass Hyaluronsäure die phänotypische Aktivierung der VSMC nicht nur mechanisch, sondern auch durch intrazelluläre Signaltransduktion *via* CD44 und RHAMM vermittelt. Die Interaktion von CD44 und Hyaluronsäure spielt in der Pathogenese der Atherosklerose eine entscheidende Rolle. Durch die Blockierung des CD44-Rezeptors konnte eine Reduktion der atherosklerotischen Läsionen um 50 - 70 % nachgewiesen werden<sup>74</sup>. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die luminale Oberfläche erodierter Plaques aus einer HA- und Versikan-reichen extrazellulären Matrix besteht<sup>106</sup>, die möglicherweise pro-thrombotische Wirkungen vermittelt<sup>5, 6</sup>. Die Hyaluronsäure beeinflusst neben dem Phänotyp vaskulärer glatter Muskelzellen auch Leukozyten, welche eine treibende Kraft während der Inflammation darstellen und somit die Progression der Atherosklerose beeinflussen.



So konnte gezeigt werden, dass Stimuli die endoplasmatischen Stress erzeugen wie z.B. das Virus-Mimetikum Poly (I.C), eine HA-Matrix induzieren, die stets die Adhäsion von Monozyten und Makrophagen stimuliert<sup>165</sup>. Zusammenfassend weisen die zitierten Untersuchungen darauf hin, dass die HA-Synthese von interstitiellen VSMC zur Neointimahyperplasie, Atherosklerose und vaskulären Entzündungsreaktionen beiträgt. Eine Hemmung der Atherosklerose durch Hemmung der HA-Synthese ist daher wahrscheinlich.

## **4.2 Einfluss des Hyaluronsäure-Syntheseinhibitors 4-MU auf die Atherosklerose**

Die intensive Untersuchung des „Hyaluronsäuresystems“ in der Tumorbilogie, Reproduktionsbiologie, bei Lungenverletzung und im kardiovaskulären System unterstützen das Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen Rolle der Hyaluronsäure *in vitro* und *in vivo*. Basierend auf den umfangreichen Belegen, die auf eine pro-atherosklerotische Rolle der HA hinweisen (4.1), war der Nachweis einer beschleunigten und verstärkten Atheroskleroseentstehung durch die Behandlung mit dem Hyaluronsäure-Syntheseinhibitor 4-Methylumbelliferon überraschend.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der ApoE-defizienten Mäuse mit 4-MU sowohl zu einer signifikanten Erhöhung des Plaquebesatzes der Aorta als auch zu einer signifikanten Steigerung der Plaquefläche des Aortenursprungs führte (Abbildung 3-1, Abbildung 3-3). Da die Reduktion der Hyaluronsäuresynthese nicht wie in der Literatur vermutet zu einer Inhibition der Atherosklerose führte, wurde der Einfluss von 4-MU auf weitere Parameter, wie den Hyaluronsäuregehalt im Plasma und im Aortenursprung, sowie die Expression der HA-Synthasen untersucht. Der HA-Plasmaspiegel war über den gesamten Untersuchungszeitraum unter Behandlung mit 4-MU im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigt (Abbildung 3-4). Zu den Untersuchungszeitpunkten von 8 und 15 Wochen war die Reduktion des HA-Plasmaspiegels unter 4-MU im Vergleich zu den Kontrollen signifikant. Die Behandlung mit 4-MU verringerte zu allen untersuchten Zeitpunkten den Hyaluronsäuregehalt in den Plaques des Aortenursprungs. Die Reduktion des HA-Gehaltes erreichte allerdings nur bei 15 Wochen alten Tieren Signifikanz (Abbildung 3-5). Des Weiteren hatte 4-MU keinen Effekt auf die

Expression der HA-Synthasen 1-3 (Abbildung 3-21), die Hyaluronsäure-abbauenden Enzyme HYAL1 und HYAL2 (Abbildung 3-22), sowie den Hyaluronsäurerezeptor CD44 (Abbildung 3-23).

Auf dem Gebiet der Tumorforschung wurde 4-MU schon häufig mit Erfolg zur Inhibition der HA-Synthese und der daraus resultierenden Inhibition der Tumorprogression eingesetzt<sup>143, 161</sup>. Eine Überexpression der HA-Synthasen wurde bereits in vielen Tumormodellen durchgeführt. In Fibrosarkoma-Zelllinien und Melanomzellen wurden durch die Überexpression von HAS1 und HAS2 die Tumorgenität und Metastasierung erhöht<sup>166, 167</sup>. Durch die Überexpression der HAS3 wurde die Proliferations- und Migrationsrate von Prostata-Karzinomen signifikant gesteigert<sup>167</sup>. Darüber hinaus ist ein erhöhter HA-Plasmaspiegel mit vielen Krebserkrankungen und einer schlechten Prognose für den Patienten assoziiert<sup>118, 119</sup>. Erhöhte HA-Plasmaspiegel wurden auch in entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. rheumatoider Arthritis, Periodontitis, Psoriasis und bei entzündlichen Darmerkrankungen nachgewiesen<sup>168</sup>. Im Gegensatz dazu ist die Funktion der einzelnen HAS-Isoformen während der Entstehung und Progression der Atherosklerose noch nicht vollständig geklärt. Aufgrund der unterschiedlichen Größe der durch die einzelnen Isoformen produzierten HA sind differenzierte physiologische Funktionen der Synthese-spezifischen Produkte wahrscheinlich. Eine *in vivo* Studie zur Überexpression der HAS2 in glatten Muskelzellen ApoE-defizienter Mäuse resultierte in einer gesteigerten Atherosklerose. *In vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass ein *knock-out* der HAS2 die Zellzyklus-Progression und die Proliferation humaner vaskulärer glatter Muskelzellen inhibiert<sup>67</sup>. Die Beobachtungen einer unveränderten Expression der HAS1-3 steht im Einklang mit den Ergebnissen von Nakazawa *et al.*, die nachweisen konnten, dass 4-MU weder die mRNA- noch die Proteinexpression der Hyaluronsäuresynthasen von *Streptococcus equi* verändert<sup>161</sup>. Dagegen konnte Kultti *et al.* in diversen Melanom- und Krebszelllinien zeigen, dass 4-MU die Expression von HAS2 hemmt<sup>169</sup>.

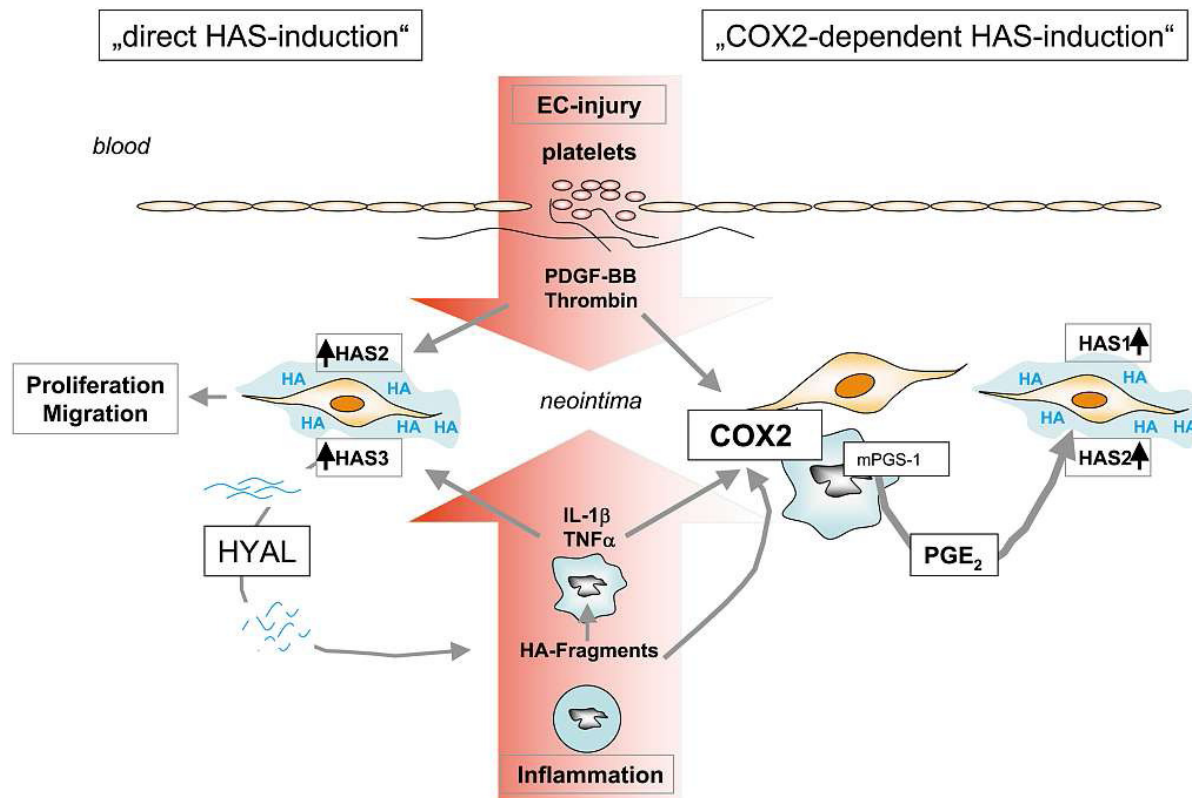
Die Reduktion des HA-Gehaltes im Plasma und im Aortenursprung hat zwar die Erwartungen an den Hyaluronsäure-Syntheseinhibitor 4-MU bestätigt, konnte jedoch keine direkte Erklärung für die Ursache der gesteigerten Atherosklerose unter Einfluss von 4-MU liefern. Nachfolgend wurde untersucht, durch welche alternativen Mechanismen die durch 4-MU gesteigerte Atherosklerose vermittelt wurde.

### 4.3 Einfluss von Hyaluronsäure auf die Inflammation während der Atherosklerose

Die Hyaluronsäure und ihre Rezeptoren spielen in der initialen inflammatorischen Phase der atherosklerotischen Plaqueprogression eine wichtige Rolle. Viele Studien wiesen auf eine Kolokalisation von Hyaluronsäure mit Makrophagen und anderen Leukozyten in atherosklerotischen Plaques arterieller Gefäße hin<sup>111, 170</sup>. Desweiteren können Lymphozyten über die Hyaluronsäure an das Endothel binden<sup>171</sup>. Sowohl Endothelzellen als auch Lymphozyten exprimieren eigenständig CD44-Rezeptoren und binden so Hyaluronsäure an der Oberfläche. Durch die feste Bindung der Hyaluronsäure über die Hyaluronsäurerezeptoren CD44 und RHAMM an das Endothel können Lymphozyten über ihren CD44-Rezeptor HA-vermittelt an das Endothel adhären<sup>171</sup>. Darüber hinaus führt die Bindung von Hyaluronsäure an den CD44-Rezeptor zu einer verstärkten Freisetzung von Zytokinen aus den gebundenen Leukozyten und zu einer verstärkten Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, sowohl auf den Leukozyten als auch auf VSMC der Gefäßwand<sup>74</sup>. Im Zusammenhang mit entzündlichen Darmerkrankungen konnte in *in vitro* Studien nachgewiesen werden, dass extrazelluläre HA-Stränge, gebildet durch intestinale glatte Muskelzellen<sup>172</sup>, Leukozyten binden und zu ihrer Retention beitragen können<sup>173</sup>.

Ein möglicher Mechanismus für die verstärkte Proliferation der VSMCs ist die Zytokin-induzierte Aufregulation der HAS-Expression. Die durch inflammatorische Reize aktivierten Makrophagen sezernieren Zytokine wie IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ , was zu einer Induktion speziell der HAS3 in VSMCs führt. Neben der Induktion der HAS wird auch die Expression der COX-2 erhöht. Die COX-2 wiederum induziert über Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) die Expression der HAS1 und HAS2<sup>174</sup>. Durch die zytokininduzierte Stimulation der HA-Synthesen kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von HA, wodurch die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen stimuliert und so die Progression der Atherosklerose gefördert werden könnte. In einer aktuellen Untersuchung an humanen atherosklerotischen Läsionen der *A. carotis* wurde eine Kolokalisation von vaskulären glatten Muskelzellen, Hyaluronsäure, Makrophagen und der COX-2 nachgewiesen<sup>67</sup>. Zusätzlich zeigten *in vitro* Versuche an humanen glatten Muskelzellen, eine Induktion

der HAS1- und HAS2-Expression als Antwort auf eine Stimulation mit  $\text{PGI}_2$  und  $\text{PGE}_2$ <sup>67</sup>.



**Abbildung 4-1** Dargestellt ist ein Modell der angenommenen Wechselwirkungen zwischen Endothelverletzung, Plättchenadhäsion, Inflammation und der Synthese von Hyaluronsäure durch VSMC, welche die Schlüsselemente in der Pathophysiologie der Atherosklerose darstellen. Eine Verletzung des Endothels und nachfolgender Plättchenadhäsion führt zu einer HAS2 Induktion und gesteigerter HA-Synthese, stimuliert durch PDGF-BB und Thrombin. Des Weiteren induziert die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen durch Monozyten und Makrophagen eine HAS3 vermittelte HA-Synthese. Zur gleichen Zeit induzieren die genannten Faktoren COX-2 und mPGES-1 in VSMC und Makrophagen, welche die  $\text{PGE}_2$ -Synthese fördern.  $\text{PGE}_2$  wiederum aktiviert G-gekoppelte  $\text{EP}_2$ -Rezeptoren in VSMC, welche die Transkription von HAS1 und HAS2 initiieren und eine HA-reiche Umgebung schaffen, welche die Proliferation und Migration der VSMC unterstützt. Als potentieller positiver „feedback-Mechanismus“ könnten niedermolekulare Degradationsprodukte der HA die Freisetzung von Zytokinen durch inflammatorische Zellen und die COX-2 Expression in VSMC durch TLR induzieren. Diese Wechselwirkungen stimulieren wahrscheinlich nicht nur die HA-Synthese und aktivieren die VSMC, sondern steigern die Inflammation, welche potentiell zur Entstehung und Progression der Atherosklerose beiträgt (nach Fischer und Schrör, 2007)<sup>174</sup>.

#### 4.3.1 Einfluss von 4-MU auf die Inflammation während der Atherosklerose

Die Inflammation ist die treibende Kraft in der Entstehung und Progression der Atherosklerose. Da die Behandlung mit 4-Methylumbelliferon zu einer signifikant

gesteigerten Atherosklerose führte, wurde der Aortenursprung der Versuchstiere auf Makrophagen und COX-2 untersucht, um so einen Eindruck über den Grad der Inflammation zu gewinnen.

Es wurde ein unerwarteter Anstieg der neointimalen Makrophageninfiltration (Abbildung 3-7) und COX-2-Expression (Abbildung 3-9) in den atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs am letzten Untersuchungszeitpunkt (25 Wochen) nachgewiesen. Der Zeitverlauf der Makrophagen-Akkumulation zeigte nach Behandlung mit 4-MU einen sehr langsamen Rückgang. Am letzten Untersuchungszeitpunkt von 25 Wochen war bei den 4-MU behandelten Tieren die Makrophagenanzahl signifikant erhöht. Dagegen ist von unbehandelten ApoE-defizienten Mäusen bekannt, dass die Makrophagen-Akkumulation nach einem Gipfel bei 10-14 Wochen sehr schnell wieder zurück geht. Dieser schnelle Anstieg und Abfall wurde auch bei den Kontrolltieren beobachtet. Möglicherweise führte 4-MU schon früher als nach 8 Wochen zu einem maximalen Anstieg der Makrophagen und verzögerte den folgenden Rückgang. Dies würde das Ausbleiben des hohen *Peaks* der Makrophagen-Akkumulation zwischen 8 und 15 Wochen unter 4-MU erklären. Alternativ hemmt 4-MU möglicherweise den Influx und den Eflux der Makrophagen. Zukünftige Untersuchungen sollten daher beginnend bei früheren Zeitpunkten angeschlossen werden.

Im Jahr 1995 zeigten Nakamura *et al.*, dass 4-MU den Anteil hochmolekularer Hyaluronsäure stärker reduziert, als den Anteil niedermolekularer Hyaluronsäure<sup>138</sup>. Es ist zurzeit ungeklärt, ob HAS1 und HAS2 stärker durch 4-MU inhibiert werden als HAS3 oder der Mangel an UDP-Glukuronsäure durch vermehrte Kettenabbrüche bei der Produktion hochmolekularer Hyaluronsäure durch HAS1 und HAS2 für die gesteigerte Produktion niedermolekularer Hyaluronsäure verantwortlich ist. Viele Studien haben gezeigt, dass die biologischen Effekte der Hyaluronsäure nicht nur von ihrer Konzentration, sondern auch von ihrer molekularen Masse abhängig sind<sup>175</sup>. So zeigten *in vitro* Experimente an verschiedenen Zelllinien, dass niedermolekulare Hyaluronsäure die Migration und Proliferation fördert und somit zu einer erhöhten Invasivität von Tumorzellen beiträgt<sup>176, 177</sup>. Im Gegensatz dazu vermittelt hochmolekulare HA vorwiegend antiinflammatorische und antiproliferative Wirkungen<sup>178</sup>.

Die gesteigerte Inflammation unter Einfluss von 4-MU könnte auch durch die Effekte der anteilig verstärkt produzierten niedermolekularen Hyaluronsäure erklärt werden.

Geht man trotz eines reduzierten Gesamtgehaltes an Hyaluronsäure davon aus, dass unter dem Einfluss von 4-MU vermehrt niedermolekulare Hyaluronsäure mit proinflammatorischer Wirkung entsteht, ist der Anstieg der Makrophageninfiltration erklärbar.

COX-2 wird in atherosklerotischen Plaques vornehmlich von vaskulären glatten Muskelzellen und Makrophagen exprimiert. Die Expression der COX-2 wird zum einen durch Entzündungsmediatoren wie Interleukin-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  gefördert, zum anderen durch einen „*feedback*-Mechanismus“ über Prostanoiden induziert<sup>179</sup>. Untersuchungen zeigten, dass eine vermehrte COX-2 Expression mit einer verstärkten Inflammation und einer Einschränkung der Endothelfunktion assoziiert ist<sup>180, 181</sup>. In einer *in vivo* Studie an LDLR-defizienten Mäusen konnte eine Reduktion der atherosklerotischen Plaques nach pharmakologischer Inhibition der COX-2 mit Rofecoxib oder Indomethacin nachgewiesen werden<sup>180</sup>. In einer humanen Studie, in der die COX-2 durch Celecoxib gehemmt wurde, zeigte sich eine Verringerung des oxidierten LDLs und eine Verbesserung der Endothelfunktion<sup>181</sup>. Die Ergebnisse der zitierten Arbeiten legen einen direkten Zusammenhang zwischen einer verstärkten Makrophageninfiltration und einer erhöhten COX-2-Expression in atherosklerotischen Plaques nahe. Damit im Einklang steht der Befund, dass in den 4-MU behandelten Tieren eine aufregulierte COX-2-Expression, in den Arealen, die viele Makrophagen enthielten, beobachtet wurde.

#### **4.3.2 Einfluss von 4-MU auf präexistente Atherosklerose**

Um den pro-atherosklerotischen Einfluss von 4-Methylumbelliferon näher zu untersuchen, wurde eine Behandlung mit 4-MU in der akuten Phase der Inflammation und eine Behandlung mit 4-MU in der postakuten Phase der Inflammation durchgeführt.

Die Behandlung mit 4-MU während der akuten Phase der Inflammation von der 10. bis zur 15. Woche zeigte keine Effekte auf die Makrophagen-Akkumulation und die Progression der Atherosklerose (Abbildung 3-17, Abbildung 3-18). Eine Erklärung dieser Ergebnisse könnte im Zeitpunkt der einsetzenden 4-MU Behandlung liegen. Da die Behandlung der Tiere erst nach Ausprägung der maximalen Inflammation begonnen wurde, war eine Verschiebung der Makrophageninfiltration und somit der inflammatorischen Antwort hin zu einem früheren Zeitpunkt nicht möglich. Der durch

die Behandlung mit 4-MU nur leicht verringerte HA-Gehalt des Aortenursprungs ist vermutlich auf die kurze Behandlungsdauer zurückzuführen.

Die Behandlung in der abklingenden Phase der Inflammation fand von der 15. bis zur 25. Woche statt. Nach dieser 10-wöchigen Behandlung konnte in der 4-MU behandelten Gruppe ein signifikanter Anstieg des Plaquebesatzes der Aorta, eine signifikante Reduktion des HA-Gehaltes in den Plaques des Aortenursprungs und eine Erhöhung der Makrophageninfiltration in den Plaques des Aortenursprungs festgestellt werden (Abbildung 3-19, Abbildung 3-20). Die Ergebnisse belegen, dass die 10-wöchige Behandlung (15 - 25 Wochen Alter) die Atherosklerose genauso verstärkt wie die 21-wöchige Behandlung von 4 - 25 Wochen Lebensalter. Somit scheint besonders die Hemmung der HA-Synthese in der fortgeschrittenen Atherosklerose zu einer verstärkten Progression beizutragen. Diese Schlussfolgerung wird unterstützt durch die Ergebnisse, die zeigen, dass eine Behandlung der frühen Atherosklerose mit 4-MU (4 - 8 Wochen) nur geringe Effekte hat.

#### **4.4 Einfluss von 4-MU auf die zelluläre Zusammensetzung der atherosklerotischen Läsionen**

Die extrazelluläre Matrix spielt eine bedeutende Rolle in der Progression der Atherosklerose<sup>20</sup>. Sie beeinflusst unter anderem die Invasion und Retention von Entzündungszellen, die Wirkung von Wachstumsfaktoren und den Phänotyp der vaskulären glatten Muskelzellen<sup>21, 22</sup>. Die vaskulären glatten Muskelzellen spielen für die Produktion der EZM in atherosklerotischen Plaques quantitativ eine bedeutende Rolle. Die histochemischen Untersuchungen des Gehalts vaskulärer glatter Muskelzellen in den atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs zeigten jedoch keine Veränderung unter dem Einfluss von 4-Methylumbelliferon. Der Gehalt an VSMC war in den Behandlungsgruppen über den gesamten Zeitverlauf von 8 bis 25 Wochen annähernd identisch (Abbildung 3-10).

*In vitro* Studien an vaskulären glatten Muskelzellen haben gezeigt, dass eine gesteigerte HA-Synthese zu einer verstärkten migratorischen und proliferativen Antwort von VSMCs beiträgt<sup>70, 163</sup>. Die durch Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  und PDGF<sup>182</sup> induzierte Proliferation glatter Muskelzellen geht immer mit der Induktion einer Hyaluronsäure- und Versikan-reichen perizellulären Matrix einher<sup>70, 163</sup>. Weitere

Studien konnten zeigen, dass die Proliferation und Migration vaskulärer glatter Muskelzellen während der Neointimahyperplasie abnimmt, wenn die Hyaluronsäure-Rezeptoren CD44 und RHAMM blockiert werden<sup>99, 164</sup>. Da in der vorliegenden Arbeit die HA-Synthese durch 4-MU gehemmt und auch der HA-Gehalt in den Plaques des Aortenursprungs reduziert wurde, hätte es, entsprechend den angeführten *in vivo* und *in vitro* Studien, zu einer Reduktion der Proliferation und Migration der VSMCs kommen sollen. Da der Anteil  $\alpha$ -SM-Aktin positiver Zellen sich aber durch die Behandlung mit 4-MU nicht veränderte, liegt der Schluß nahe, dass andere Faktoren wie z.B. Wachstumsfaktoren oder Zytokine einen stärkeren Einfluss auf die Proliferation der SMC hatten. Alternativ könnten vielleicht mehr differenzierte ( $\alpha$ -SM-Aktin-positive) VSMC den Rückgang der Proliferation kompensieren. Um diese Frage abschließend zu klären sollte die Proliferation der VSMC direkt bestimmt werden, z.B. nach Inkorporation von BrdU.

Da anhand dieses Befundes auszuschließen war, dass die glatten Muskelzellen für die Volumenexpansion der atherosklerotischen Plaques verantwortlich waren, wurde die Expression von Kollagen untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied im Gesamtkollagengehalt unter Einfluss von 4-MU zwischen den beiden Untersuchungsgruppen nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich eine verringerte Packungsdichte der Kollagenfasern nach Behandlung mit 4-MU bei 15 Wochen alten Tieren (Abbildung 3-12). Kollagen ist ein integraler Bestandteil der vaskulären Wand und trägt zur strukturellen Integrität der Gefäße bei. Die zelluläre Differenzierung, Adhäsion, Migration und Proliferation werden unter anderem durch Kollagene beeinflusst<sup>183</sup>. Der Kollagengehalt atherosklerotischer Plaques steigt mit der Progression der Atherosklerose an<sup>184</sup>. Bei fortgeschrittener Progression der atherosklerotischen Plaques geht man von einem maximalen Kollagenanteil von 60 %, bezogen auf den Gesamtproteinanteil, aus<sup>184</sup>. Diese Ergebnisse können in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Der Kollagengehalt liegt hier zu den späteren Untersuchungszeitpunkten zwischen 40 % und 50 % bezogen auf die Plaquerfläche. Die unveränderte Gesamtkollagenmenge belegt die Spezifität von 4-MU für die HA-Synthese bzw. schließt gleichzeitig die Hemmung der Kollagen *de novo* Synthese aus.

Die unter der Behandlung mit 4-MU verringerte Packungsdichte des Kollagens bei 15 Wochen alten Tieren kann durch die beschleunigte Progression der Atherosklerose



erklärt werden. Die geringere Packungsdichte weist auf neu gebildetes Kollagen hin<sup>184</sup>, das hauptsächlich in Plaques mit gesteigerter Progressionsrate zu finden ist. Fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen bestehen dagegen überwiegend aus dicht gepacktem Kollagen, das maßgeblich zur Plaquestabilität beiträgt<sup>184</sup>.

Da 4-MU keinen Einfluss auf das Gesamtkollagen hatte und so die Volumenexpansion der atherosklerotischen Plaques unter Behandlung mit 4-MU nicht erklärt werden konnte, wurden die Proteoglykane Biglykan und Decorin als weitere essentielle Bestandteile der extrazellulären Matrix untersucht. Die immunhistologischen Anfärbungen von Biglykan- und Decorin-Kernproteinen zeigte sowohl bei Biglykan als auch bei Decorin keine Veränderungen unter Einfluss von 4-MU (Abbildung 3-14). In einer früheren *in vivo* Studie an ApoE-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an kleinen Leucin-reichen Proteoglykanen mit dem Ausmaß der Atherosklerose korreliert<sup>26</sup>. In dieser Studie wurde die Expression von Biglykan und Decorin durch einen AT1-Antagonisten gehemmt, was sowohl zu einer signifikanten Reduktion des Plaquebesatzes der Aorta als auch der Plaquegröße des Aortenursprungs führte<sup>26</sup>. Des Weiteren wurde in vielen Studien nachgewiesen, dass Biglykan die LDL-Retention in der vaskulären EZM unterstützt<sup>185, 186</sup>. Diese Retention von LDL durch Proteoglykane ist laut der „*response to retention*“-Hypothese der initiale Schritt in der Entstehung der Atherosklerose<sup>156</sup>. Huang *et al.* konnten an LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen eine signifikante Steigerung der Biglykan-Expression durch die Infusion von Angiotensin II nachweisen. Die verstärkte Expression von Biglykan in der EZM und die als Folge gesteigerte Bindung von LDL führten zu einer beschleunigten Progression der Atherosklerose<sup>187</sup>. Die zitierten Studien belegen die pro-atherosklerotischen Wirkungen einer verstärkten Biglykan-Expression in der EZM. Da die Biglykan- und Decorin-Expression durch die Behandlung mit 4-MU nicht verändert wurde, kann die beobachtete Verstärkung der Atherosklerose nicht auf Veränderungen der Expression dieser Proteoglykane zurückgeführt werden.

Eine weitere mögliche Erklärung für die Beeinflussung der Atherosklerose durch Biglykan und Decorin ohne eine Veränderung der Expression der Kernproteine bietet eine Veränderung der GAG-Kettenlänge. Die verstärkte Freisetzung von Wachstumsfaktoren (PDGF-BB, TGF- $\beta$ , NO) durch VSMCs und Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen stimuliert eine Hyperelongation der GAG-Seitenketten

verschiedener Proteoglykane<sup>188</sup>. Durch die verlängerten GAG-Ketten kommt es zu einer vermehrten Bindung von LDL und somit zu einer beschleunigten Progression der Neointimahyperplasie und der Atherosklerose<sup>186</sup>. Die immunhistochemischen Färbungen sind nicht geeignet, eine eventuell vorliegende elongierte Form von Biglykan und Decorin zu detektieren, da die verwendeten Antikörper nur gegen das Kernprotein gerichtet sind. Die Theorie der elongierten Proteoglykan GAG-Ketten könnte die Vergrößerung der Plauefläche des Aortenursprungs unter 4-MU ohne eine direkte Veränderung des VSMC- und Kollagen-Gehaltes erklären. Diese Überlegungen lassen eine Untersuchung der Größenverteilung der Proteoglykane in der EZM vaskulärer Läsionen durch Western Blots bzw. die Untersuchung der GAG-Kettenlängen vielversprechend erscheinen.

Neben den Hauptbestandteilen der extrazellulären Matrix wurde die Expression des Hyaluronsäurerezeptors RHAMM im Aortenursprung untersucht. Da 4-Methylumbelliferon den Gehalt an Hyaluronsäure in den Plaques des Aortenursprungs signifikant senkt, war auch eine Beeinflussung von RHAMM denkbar. Die Untersuchungen zeigten zu den frühen und späten Untersuchungszeitpunkten eine leichte Erhöhung der RHAMM Expression unter Einfluss von 4-MU. In den 15 Wochen alten Tieren zeigte sich analog zu der unter 4-MU signifikant verringerten Akkumulation von Makrophagen, auch eine signifikant erniedrigte RHAMM-Expression (Abbildung 3-6).

Über RHAMM ist bekannt, dass der Rezeptor Paxillin, einen Bestandteil des fokalen Adhäsionskomplexes, aktivieren kann<sup>97</sup>, wodurch RHAMM die Motilität der Zellen reguliert<sup>98</sup>. Eine Überexpression von RHAMM steigert dementsprechend die Zellmotilität<sup>99</sup>. Savani *et al.* zeigten anhand von *scratch*-Assays an bovinen aortalen SMCs, dass die Expression von RHAMM in den Zellen nach einer induzierten Verletzung ansteigt und eine Migration auslöst<sup>189</sup>. Die leicht vermehrte RHAMM-Expression wird möglicherweise über eine „*feedback*“ Gegenregulation durch die verminderte HA-Synthese ausgelöst. Über eine vermehrte Expression des HA-Rezeptors RHAMM könnte so der verminderten HA-Synthese funktionell entgegengewirkt werden und die durch RHAMM vermittelte Zellmotilität aufrecht erhalten werden<sup>98</sup>. Alternativ könnte RHAMM in den Makrophagen aufreguliert werden und eine funktionelle Rolle für die veränderte Entzündungsantwort spielen.

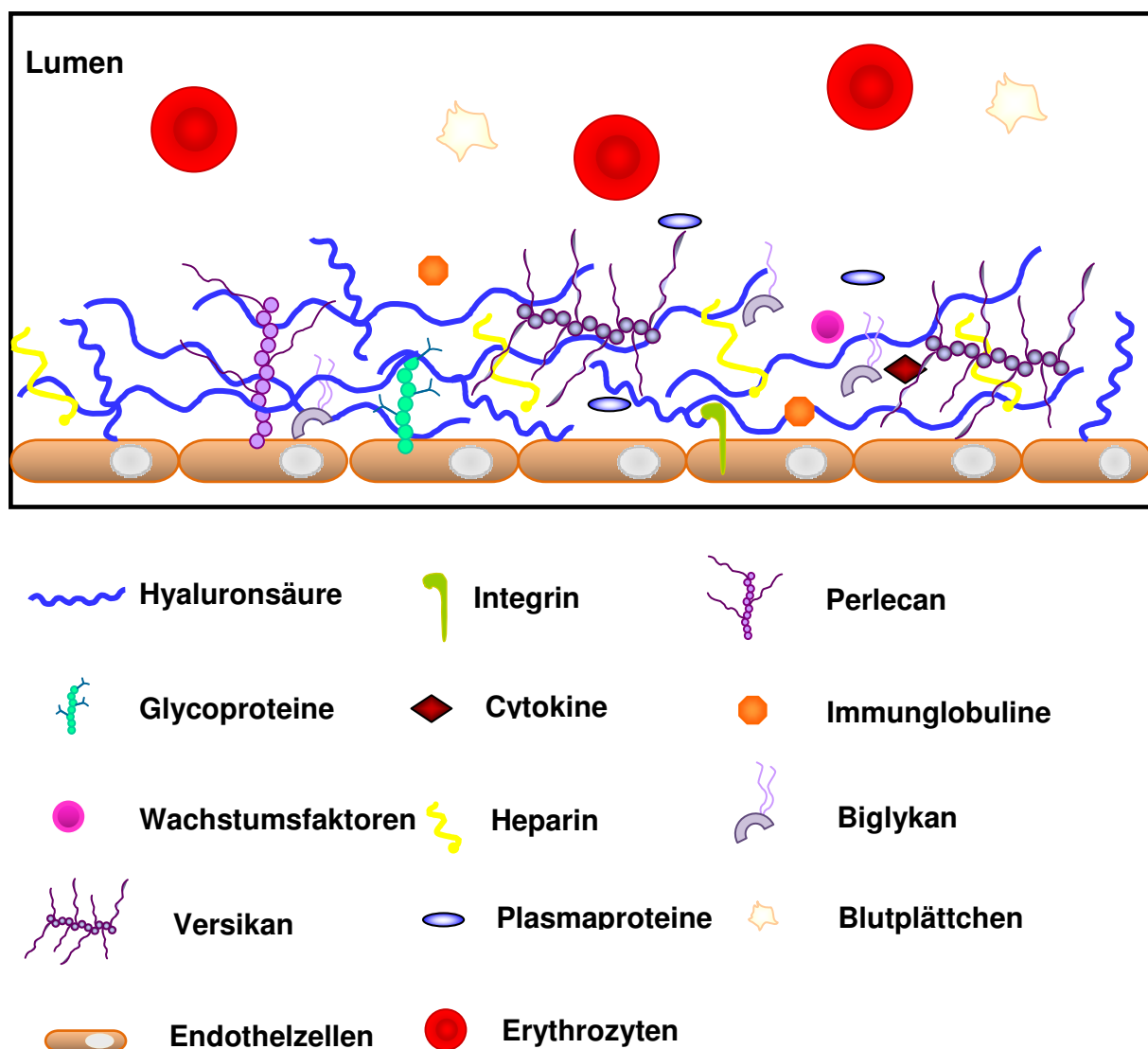
**Fazit:**

Die Behandlung von ApoE-defizienten Mäusen auf atherogener Diät mit 4-Methylumbelliferon führte wie erwartet zu einer signifikanten Senkung des Hyaluronsäuregehaltes im Plasma und in den Plaques des Aortenursprungs. Entgegen der gut dokumentierten pro-atherosklerotischen Wirkung der Hyaluronsäure führte in diesem Atherosklerosemodell die Inhibition der Hyaluronsäureproduktion durch 4-MU in den durchgeführten Versuchen zu einer beschleunigten Progression der Atherosklerose. Die verstärkte Atherosklerose ging mit einer gesteigerten Makrophageninfiltration und COX-2-Expression zu späten Zeitpunkten einher. Desweiteren konnte keine Veränderung in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und dem Gehalt an glatten Muskelzellen der atherosklerotischen Läsionen festgestellt werden.

Da diese Befunde keinen Anhaltspunkt für die Ursache der unter 4-MU gesteigerten Atherosklerose ergaben, wurde nach alternativen Erklärungsmöglichkeiten für dieses unerwartete Phänomen gesucht.

#### 4.5 Auswirkungen einer zerstörten Glykokalyx

Die intakte endotheliale Glykokalyx ist ein Netzwerk bestehend aus Hyaluronsäure, Proteoglykanen, Glykoproteinen und gebundenen Plasmaproteinen. Sowohl die Hyaluronsäure als auch das Heparansulfat sind grundlegend für die Integrität und Funktion der Glykokalyx, wie durch enzymatische Entfernung dieser Glukosaminoglykane gezeigt wurde<sup>43, 190</sup>. Die Glykokalyx ist durch ihre Lage zwischen dem Blutstrom und dem Endothel ein wichtiger Faktor, der unter anderem die vaskuläre Permeabilität bestimmt<sup>43, 44</sup>.



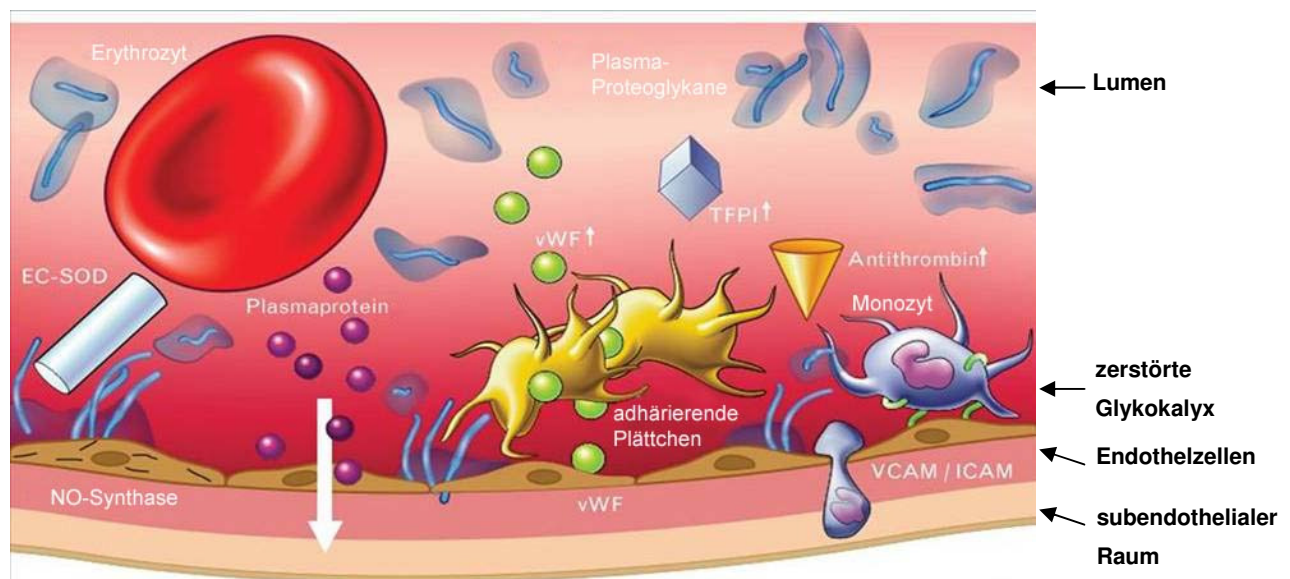
**Abbildung 4-2** Schematische Darstellung der intakten Glykokalyx mit ihren Komponenten. Dargestellt sind Endothelzellen, von denen Hyaluronsäure, Proteoglykane, Integrine und Glukoproteine ausgehen. Dieses Netzwerk bindet weitere Hyaluronsäure, Proteoglykane wie Versikan und Biglykan, Heparansulfat, diverse Plasmaproteine und Wachstumsfaktoren. Im Lumen der Gefäße sind Erythrozyten und Thrombozyten dargestellt.

Schädigungen oder Degradation der endothelialen Glykokalyx führen zu klinisch relevanten Veränderungen, da aus der Abnahme der Glykokalyxdicke eine erhöhte Permeabilität der Gefäßwand für Makromoleküle resultiert<sup>46, 191</sup>. Des Weiteren spielt die Glykokalyx bei wichtigen Krankheitsbildern wie Atherosklerose<sup>60</sup>, Diabetes<sup>192</sup>, Sepsis<sup>193</sup>, Ischämie/Reperfusion<sup>194</sup> und Tumormetastasierung<sup>195</sup> eine entscheidende Rolle. Zur Funktion der Glykokalyx während einer Ischämie zeigten Chappell *et al.* an isolierten Meerschweinchenherzen, dass eine 20-minütige isotherme Ischämie ausreicht, um die Glykokalyx nahezu vollständig zu degradieren<sup>191</sup>. Dazu konnten Rehm *et al.* in einer weiteren Studie zeigen, dass bei gefäßchirurgischen Eingriffen mit globaler Ischämie ein Anstieg der Glykokalyxhauptbestandteile im Plasma der Patienten während der Reperfusion festgestellt werden konnte<sup>194</sup>. Die intraoperative Zerstörung der Glykokalyx war proportional zum Ausmaß und zur Dauer der Ischämie. Bei einer diabetischen Erkrankung wird das vaskuläre System beeinträchtigt, es kommt zu einer verminderten NO-Synthese und zu einer verstärkten vaskulären Permeabilität. Nieuwdorp *et al.*, untersuchten das Ausmaß der Glykokalyx an gesunden und diabetischen Patienten und konnten ein halbiertes Volumen der Glykokalyx unter Hyperglykämie feststellen. Parallel zu der Volumenhalbierung der Glykokalyx wurde eine erhöhte Menge an Bestandteilen der Glykokalyx im Blut nachgewiesen, was für ein erhöhtes „shedding“ der Glykokalyx spricht<sup>196</sup>. Es wird diskutiert, ob die Störung der Glykokalyx bei diabetischen Patienten zu der ebenfalls festgestellten Intima/Media Verdickung beiträgt<sup>192</sup>. Im Fall der Tumormetastasierung spielt die Heparanase, ein Enzym, das die Heparansulfat-Seitenketten der Glykosaminoglykane abspaltet, eine wichtige Rolle<sup>195</sup>. *In vivo* Versuche an Mäusen konnten bei einer Überexpression der Heparanase eine deutliche Zunahme an Melanomen, Lymphomen und Karzinomen nachweisen<sup>197</sup>. Bei Patienten mit einem septischen Schock konnte von Nelson *et al.*, ebenfalls eine vermehrte Zirkulation von Glykokalyxbestandteilen festgestellt werden<sup>193</sup>.

In der Atherosklerose könnte der Verlust der vasoprotektiven Eigenschaften der endothelialen Glykokalyx auch entscheidend zur Pathogenese dieser vaskulären Erkrankung beitragen<sup>60</sup>. Durch eine Schädigung oder Degradation büßt die Glykokalyx ihre Barrierefunktion, die eine unmittelbare Interaktion sowohl zwischen zellulären als auch löslichen Bestandteilen des Blutes und der Endothelschicht verhindert, weitgehend ein. Dies ist insbesondere für die Atherosklerose-Entstehung

von Bedeutung, da die Adhäsion von Makrophagen an die Gefäßwand und die folgende Transmigration als initialer Schritt der Atherogenese angesehen wird<sup>46, 47</sup>.

Im nachfolgenden Schaubild werden die wichtigsten Konsequenzen einer zerstörten Glykokalyx zusammenfassend dargestellt. Der Verlust der Glykokalyx wird zurückgeführt auf die endotheliale Dysfunktion und geht mit erhöhter vaskulärer Permeabilität, Aktivierung der Blutgerinnung und Adhäsion und Migration von Entzündungszellen in den subendothelialen Raum einher. Durch die verminderte NO-Synthese kommt es zu einer reduzierten NO-Verfügbarkeit, wodurch der oxidative Stress erhöht wird. Desweiteren nimmt die Permeabilität der Endothelzellen für Makromoleküle zu. Die Adhäsion von Plättchen an die Endothelzellen wird durch die fehlende Glykokalyx vereinfacht und es kommt infolge dessen zu einer vermehrten Thrombingeneration.



**Abbildung 4-3** Darstellung der pathophysiologischen Rolle der zerstörten Glykokalyx. Die endotheliale Glykokalyx reguliert die Aktivität der NO-Synthase, die bei einer zerstörten Glykokalyx eingeschränkt funktioniert. Die Funktion der Glykokalyx als physikalische Barriere für Makromoleküle zwischen Lumen und Endothelzellen ist durch eine zerstörte Glykokalyx ebenfalls aufgehoben. Die Anheftung von Plättchen und Leukozyten an die Endothelzellen ist bei einer gestörten Glykokalyx gesteigert (modifiziert nach Nieuwdorp *et al.*<sup>60</sup>).

## 4.6 Auswirkungen der zerstörten Glykokalyx auf die Inflammation

Da die Glykokalyx einem dynamischen Gleichgewicht aus Auf- und Abbau unterliegt ist das Ausmaß der Glykokalyx variabel. Die Größe ist unter anderem abhängig vom Typ und der Lokalisation des Blutgefäßes. Die Glykokalyx erreicht eine Dicke von 0,2 - 3  $\mu\text{m}$ . Die Länge der endothelialen Membranproteine die in das Gefäßlumen ragen wird von der Glykokalyx deutlich überschritten<sup>198</sup>. Daher wird angenommen, dass die räumliche Struktur der Glykokalyx die Anheftung von Leukozyten und Plättchen über endotheliale Adhäsionsrezeptoren wie ICAM, VCAM oder von Willebrand Faktor sterisch behindert<sup>33, 198, 199</sup>. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Leukozytenadhäsion am Endothel zunimmt, sobald die Glykokalyx enzymatisch abgebaut wurde<sup>200, 201</sup>.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Reduktion der Glykokalyx unter 4-MU Behandlung beobachtet werden. Bei den Kontrolltieren konnte eine Dicke der Glykokalyx von 15 nm nachgewiesen werden, welche unter Einfluss von 4-MU auf 9 nm reduziert wurde. Nach Verdau mit Hyaluronidase wiesen die Kontrolltiere eine Glykokalyxdicke von 8 nm auf (Abbildung 3-35).

Neuere Studien haben mittels einer Markierungstechnik auf Lanthanid-Basis in insulierten und perfundierten Meerschweinchenherzen eine intakte endotheliale Glykokalyx mit einer Dicke von 500 nm dargestellt, die teilweise sogar dicker als die Endothelzellschicht war<sup>191, 202</sup>. Untersuchungen, in denen die Glykokalyx mithilfe der Konfokalmikroskopie dargestellt wurde, lassen vermuten, dass die Dicke der Glykokalyx in großen arteriellen Gefäßen bis zu 4  $\mu\text{m}$  betragen kann. Die in dieser Arbeit festgestellte Dicke der Glykokalyx liegt deutlich unter diesen Angaben. Für die geringe Dicke der Glykokalyx in unserem Modell ist wahrscheinlich eine Vielzahl von Faktoren verantwortlich. Van den Berg *et al.*, berichteten 2005 von einer deutlichen Reduktion der Glykokalyx in Folge einer cholesterol- und fetthaltigen Diät im Vergleich zu den Kontrollen. Darüber hinaus konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass ApoE\*3-Leiden-Mäuse eine verringerte Dicke der Glykokalyx im Vergleich zu C57BL6 Mäusen aufweisen, die unabhängig von einer fettreichen Diät war<sup>52</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurden Apolipoprotein E defiziente Mäuse als Modell für eine spontan auftretende Atherosklerose verwendet. Zusätzlich wurden die Tiere

über den gesamten Versuchszeitraum mit einer fett- und cholesterolreichen Western Diät gefüttert, wodurch nach den Ergebnissen von van den Berg *et al.*, das Ausmaß der Glykokalyx weiter reduziert wird. Desweiteren ist bekannt, dass die Dicke der Glykokalyx durch Störungen der Hämodynamik, zum Beispiel vor Gefäßverzweigungen oder durch atherosklerotische Plaques, drastisch reduziert wird<sup>52</sup>. Daher könnte auch die Hyperlipidämie und die Atherosklerose für die geringe Dicke der Glykokalyx im vorliegenden Tiermodell verantwortlich sein. Alternativ könnte die Glykokalyx durch das zur Darstellung verwendete Rutheniumrot kondensiert werden. In der Literatur wurde die Glykokalyx zum Teil *in vivo* indirekt vermessen oder es wurde als alternatives Fixativum Alzian Blau verwendet. Diese methodischen Unterschiede könnten die abweichenden absoluten Messwerte für die Dicke der Glykokalyx erklären.

Eine veränderte Struktur der Glykokalyx erleichtert Leukozyten und Thrombozyten die Anheftung an die Endothelzellen und führt so zu Inflamationsreaktionen mit vermehrter Zytokinausschüttung. Zytokine wie TNF- $\alpha$  führen wiederum zu einer Reduktion der endothelialen Glykokalyx. Henry und Duling zeigten in einer Untersuchung an Hamstern, dass eine Stimulation mit TNF- $\alpha$  zu einer gesteigerten Permeation von Makromolekülen in die Glykokalyx führte und somit die Inflammation begünstigte<sup>203</sup>. Mit diesem Befund übereinstimmend zeigten Marechal *et al.*, dass die *i.v.* Applikation von LPS in Ratten zu einer mikrovaskulären Dysfunktion mit unmittelbarer Degradation der Glykokalyx führte<sup>204</sup>. Mulivor und Lipowsky bestätigten, dass die Zusammensetzung der endothelialen Glykokalyx entscheidenden Einfluss auf die Entstehung der Inflammation hat. Die Bestandteile der Glykokalyx, wie z.B. die Hyaluronsäure, blockieren auch die Zytokin-Bindungsstellen der Selektine und bestimmen dadurch die Menge der Zytokine, die in die Gefäßwand diffundieren<sup>205</sup>. In Versuchen zu einer zytokininduzierten Inflammation mit TNF- $\alpha$  konnte gezeigt werden, dass es zu einem schnellen „shedding“ der Glykokalyx mit zunehmender Leukozytenanheftung an das Endothel kam. Die Vorbehandlung mit einem löslichen TNF- $\alpha$ -Rezeptor konnten diese Effekte auf die Glykokalyx verhindern<sup>206</sup>.

Die Aspekte der proinflammatorischen und proatherosklerotischen TNF- $\alpha$ -Funktion wurden in der vorliegenden Arbeit möglicherweise durch die chronische Inhibierung der HA-Synthese durch 4-Methylumbelliferon imitiert und verstärkt. Somit könnte die



Veränderung der Glykokalyx die verstärkte Akkumulation von Makrophagen bedingen, wodurch die beschleunigte Progression der Atherosklerose erklärt würde. Die Annahme einer durch 4-MU zerstörten Glykokalyx mit nachfolgend verstärkter Inflammation, bietet daher eine Erklärung für die in dieser Arbeit vorliegenden Befunde der gesteigerten Entzündung und Atherosklerose.

#### 4.7 Einfluss von 4-MU auf die Endothelfunktion

Eine ausgeprägte Atherosklerose geht durch die Endotheldysfunktion und Einschränkung der Gefäßrelaxation häufig mit einer Erhöhung des Blutdrucks einher. Lee *et al.* zeigten erst kürzlich in einer Untersuchung an Hypertonikern, dass es zu einem signifikanten Anstieg des Intima/Media-Quotienten der *A. carotis* bei vorbestehender Hypertonie kommt<sup>207</sup>. Eine Studie an ApoE-defizienten Mäusen zeigte, dass eine Blutdruckerniedrigung, ausgelöst durch einen AT<sub>1</sub>-Antagonisten, den Plaquebesatz der Aorta reduziert<sup>26</sup>. Dieser Zusammenhang zwischen gesteigertem Blutdruck und vermehrter Atherosklerose konnte auch in der vorliegenden Untersuchung der Atherosklerose bestätigt werden. Unter der Behandlung mit 4-MU wurde ein erhöhter systolischer Blutdruck nachgewiesen (Abbildung 3-24), der wahrscheinlich auf die verschlechterte endotheliale Relaxation zurückzuführen war.

Die verschlechterte Endothelfunktion wurde an isolierten Aortenringen im Organbad anhand der Acetylcholin-abhängigen Vasorelaxation nachgewiesen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass 4-MU Behandlung die maximale Kontraktionsfähigkeit der Aortenringe nach Stimulation mit Phenylephrin steigert (Abbildung 3-26, Abbildung 3-27). Daher kommen sowohl eine verschlechterte endotheliale NO-Freisetzung als auch eine erhöhte Kontraktilität der Gefäße als Ursache für die erhöhten Blutdruckwerte in Frage. Eine Reihe von Untersuchungen zeigte, dass die endotheliale Glykokalyx eine bedeutende Rolle in der durch Scherstress ausgelösten Mechanotransduktion spielt. Florian *et al.* konnte feststellen, dass Heparansulfat-Proteoglykane wichtige Mechanosensoren der Endothelzellen sind<sup>50</sup>. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die enzymatische Entfernung der Heparansulfate oder der Hyaluronsäure aus der Glykokalyx die durch Scherstress ausgelöste NO-Freisetzung aus den Endothelzellen verhindert. Der Abbau der Chondroitinsulfate

hatte dagegen keine Auswirkung auf die NO-Freisetzung durch Scherstress<sup>208, 209</sup>. Tkachenko *et al.* zeigten, dass es durch Inhibition der Hyaluronsäuresynthese in intakten Gefäßen, zu einer Reduktion der Scherstress-abhängigen Mechanotransduktion und der NO-Freisetzung aus den Endothelzellen kommt<sup>210</sup>. Daraus lässt sich schließen, dass die Abnahme der Glykokalyx nach 4-MU Behandlung auch eine kausale Rolle für die endotheliale Dysfunktion spielt. Zusammengefasst belegen frühere Studien eine Beteiligung der Glykokalyx an einer Scherstress-induzierten aber nicht an einer Acetylcholin-induzierten Vasodilatation<sup>211</sup>. Im Gegensatz dazu konnten wir nachweisen, dass die Acetylcholin-induzierte, Endothel-abhängige Vasodilatation durch 4-MU negativ beeinflusst wurde<sup>211</sup>. Als Erklärung für den zur Literatur widersprüchlichen Befund ist es vorstellbar, dass die chronische Störung der Glykokalyx über die gesamte Behandlungsperiode sekundäre Veränderungen der Endothelfunktion, einschließlich der veränderten Acetylcholin-induzierten endothelabhängigen NO-Freisetzung, ausgelöst hat. Allerdings sind weiterführende Untersuchungen der molekularen Mechanismen der 4-MU induzierten endothelialen Dysfunktion notwendig.

#### **4.8 Einfluss von 4-MU auf die Thromboseneigung**

Durch die Behandlung mit 4-Methylumbelliferon kam es zu einer Blutdruckerhöhung und einer eingeschränkten Endothelfunktion in den untersuchten Mäusen. Generell kommt es bei einer Endothelschädigung zu verstärktem Kontakt zwischen pro-koagulatorischen Proteinen der Gefäßwand und dem Blutstrom. Da die Thrombusbildung durch diese Gefäßveränderungen begünstigt werden kann, wurde die Veränderung der Thromboseneigung durch die Behandlung mit 4-MU untersucht. Die Zeit bis zu einer stabilen Okklusion der Gefäße war unter der Behandlung mit 4-Methylumbelliferon signifikant verkürzt. Ebenso zeigte sich ein Unterschied hinsichtlich des Auftretens zyklischer Flussveränderungen, bei denen die Häufigkeit der spontanen Thrombusablösung unter 4-MU signifikant reduziert war. Die Zeit bis zur ersten Okklusion der Gefäße zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit 4-MU behandelten und den unbehandelten Tieren (Abbildung 3-28). Eine mögliche Erklärung für den pro-thrombotischen Effekt von 4-Methylumbelliferon bietet die veränderte Funktion der Glykokalyx. Die sterische Verhinderung der Interaktionen von Bestandteilen des Blutes mit Endothelzellen durch die Glykokalyx,

wie schon im Bezug auf Leukozyten beschrieben, trifft wahrscheinlich auch auf die Thrombozyten zu<sup>192</sup>. Ferner beinhaltet die Glykokalyx anti-thrombotische Effektoren wie Antithrombin und *Tissue Faktor Pathway Inhibitor*. Die experimentelle Entfernung der Glykokalyx erhöht die Anheftung von Thrombozyten an myokardiale Kapillargefäße<sup>212</sup>. Ein weiterer Faktor der sich pro-thrombotisch auswirkt ist die verminderte NO-Freisetzung aus den Endothelzellen bei vorliegender Schädigung. Das NO ist somit nicht mehr in der Lage seine Thrombozyten-aggregationshemmende Wirkung zu entfalten, wodurch es an Stellen mit vermindertem Scherstress häufiger zur Thrombusbildung kommt<sup>213</sup>. Des Weiteren wurde erst kürzlich eine erhöhte Thromboseneigung im Zusammenhang mit einer LPS induzierten Schädigung der Glykokalyx nachgewiesen<sup>206</sup>.

Dass die Zeit bis zur ersten Okklusion keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen zeigte war in diesem Modell der photochemisch induzierten Thrombose zu erwarten. In diesem Modell wird durch Laserbestrahlung schnell eine ausgeprägte lokale Endothelschädigung induziert. Aus diesem Grund kann das System auch zur Erzeugung eines Myokardinfarktes eingesetzt werden<sup>214</sup>. Die im Vergleich zur akuten laserinduzierten Läsion gering ausgeprägte chronische Endothelschädigung unter 4-MU wird zu Beginn von der laserinduzierten Schädigung überdeckt. Im weiteren Versuchsverlauf könnte die durch 4-MU vorbestehende Schädigung des Endothels und der Glykokalyx zunehmend an Bedeutung für die Thrombusadhärens und –stabilität gewinnen, wodurch die Effekte auf die spontane Thrombusablösung und die stabile Okklusion erklärt würden.

Folglich könnte die durch chronische 4-MU Behandlung ausgelöste Verringerung der Glykokalyx für die in der vorliegenden Arbeit beschriebene pro-thrombotische Wirkung verantwortlich sein.

Zusätzlich wurde die Blutungsdauer nach einer definierten Verletzung bis zum Wundverschluss gemessen. Bei dieser so genannten „*tail cut bleeding*“ Methode zeigte sich eine signifikante Verkürzung der Blutungszeit unter Einfluss von 4-MU (Abbildung 3-29). Möglicherweise könnte die verstärkte Adhäsion der Thrombozyten den pro-atherosklerotischen Effekt von 4-MU teilweise erklären, da Thrombozytenadhäsion zur Atherogenese beiträgt. Dies wurde durch Inhibition der Thrombozytenadhäsion, zum Beispiel durch Blockade des Glykoprotein IIb Integrins und der damit einhergehenden Hemmung der Atherosklerose gezeigt.

#### **4.8.1 Einfluss von 4-MU auf die Plättchenaktivierung und das endogene Thrombinpotential**

Um zu überprüfen, ob der beschleunigte Wundverschluss und die erhöhte Thromboseneigung durch 4-MU auf eine erhöhte Plättchenaktivierung zurückzuführen sind, wurde mittels FACS-Analysen die Oberflächenexpression von P-Selektin nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass die basale Aktivität der Plättchen durch die Behandlung mit 4-MU nicht beeinflusst wurde. Die maximale Aktivierbarkeit der Plättchen war unter Einfluss von 4-MU sogar signifikant erniedrigt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die erhöhte Thromboseneigung nicht auf einer veränderten Plättchenfunktion beruht. Dieser Befund unterstützt die Annahme, dass die zerstörte Glykokalyx Auslöser der gesteigerten Thromboseneigung ist. Die geringere maximale Aktivierbarkeit der Plättchen könnte auf einem systemischen 4-MU Effekt beruhen.

Als nächstes wurde das endogene Thrombinpotential (ETP) des Plasmas bestimmt. Auch das ETP wurde durch die Behandlung mit 4-Methyumbelliferon nicht verändert. Geschwindigkeit und Ausmaß der Thrombinbildung waren im Plasma der behandelten und unbehandelten Tiere identisch. Da weder die Plättchenaktivität noch das endogene Thrombinpotential durch den Hyaluronsäuresynthese-Inhibitor 4-MU beeinflusst wurden, kann man direkte Effekte von 4-MU auf die Plättchenfunktion oder die Gerinnung ausschließen.

#### **4.9 Einfluss von 4-MU auf die Neointimahyperplasie**

In den ApoE-defizienten Mäusen wurde durch eine Ligatur der *A. carotis* eine Neointimahyperplasie induziert<sup>148, 215</sup>. Der Einfluss von 4-Methylumbelliferon auf die Ligatur-induzierte Neointimahyperplasie wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Behandlung mit 4-Methylumbelliferon zeigte keine beschleunigte Progression der Neointimaformation. Das Lumen, die Dicke der Media, die Dicke der Neointima und auch der Quotient zwischen Intima und Media wurden durch die Behandlung mit 4-MU nicht beeinflusst (Abbildung 3-38). Auch der Gehalt an Hyaluronsäure und Makrophagen in der Neointimahyperplasie zeigte unter der Behandlung mit 4-MU keine Unterschiede (Abbildung 3-39).

Das Modell der *Carotis*-Ligatur erzeugt eine Neointima vorwiegend aufgrund der Induktion von Proliferation und Migration von VSMC. Dass 4-MU in diesem Restenose-Modell keinen Effekt hatte, unterstreicht die Spezifität der pro-atherosklerotischen Wirkung. Bei der Atherosklerose spielen eine Vielzahl von Faktoren, wie in dem vorangegangenen Kapitel dargestellt, eine Rolle, u.a. die Glykokalyx. Dagegen ist das Ligationsmodell ein akutes Modell, das hauptsächlich durch die experimentell erzwungene Stase induziert wird. Der fehlende Effekt von 4-MU steht somit im Einklang mit der Arbeitshypothese, dass eine Hemmung der HA-Synthese durch 4-MU über eine chronische Hemmung der Glykokalyx die Atheroprogression unterstützt. Für die reine Neointimahyperplasie dürfte eher eine Hemmung aufgrund verminderter VSMC Proliferation und Migration erwartet werden. Ein Trend zu einer Hemmung der Neointimahyperplasie deutete sich auch an und sollte in zukünftigen Untersuchungen zu kürzeren Zeitpunkten nach Ligatur untersucht werden.

#### **4.10 Potential des 4-MU für therapeutische Zwecke**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern neue Informationen über den Effekt einer systemischen Inhibition der HA-Synthese auf die Progression der Atherosklerose und der vaskulären Hämostase. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die systemische Inhibition der HA-Synthese ungünstig ist und unterstützen die Schlussfolgerung, dass versucht werden sollte die HA-Synthese in lokalen Bereichen mit hohem Risiko einer Neointimaverdickung zu inhibieren. In zukünftigen Studien muss untersucht werden, ob möglicherweise die selektive Inhibition spezifischer HA-Synthasen eine Neointimahyperplasie reduzieren könnte ohne die Funktion der endothelialen Glykokalyx zu beeinflussen.

Die vorliegende Arbeit zeigte zum ersten Mal die Wirkung einer pharmakologischen Inhibition der Hyaluronsäuresynthasen auf die Endothelfunktion sowie Entstehung und Progression der Atherosklerose. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der funktionellen Veränderungen der endothelialen Glykokalyx und der zugrunde liegenden Mechanismen.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der systemischen Hyaluronsäuresynthese durch den selektiven HAS(1-3)-Inhibitor 4-Methylumbelliferon zu einer Reihe vaskulärer Veränderungen führt. Die Inhibition der HA-Synthese verursacht eine Schädigung der endothelialen Glykokalyx, die in der Folge eine endotheliale Dysfunktion auslöst. Durch die endotheliale Dysfunktion kommt es zu einer erhöhten Makrophageninfiltration und einer beschleunigten Progression der Atherosklerose. Darüberhinaus führt die HA-Depletion der Glykokalyx zu einer erhöhten Thromboseneigung, die nicht auf erhöhtes Thrombinpotential oder eine Plättchenaktivierung zurückzuführen ist.

Bisherige Veröffentlichungen zeigten, dass HAS3 die kleinsten und somit aktivsten HA-Polymere synthetisiert, die auch am stärksten in der Signaltransduktion involviert sind<sup>216</sup>. Zudem wird der HAS3 eine proliferations- und migrationsfördernde Rolle zugeschrieben, die in Studien zu invasiven Tumorzellen eindeutig belegt sind<sup>86, 217</sup>. Die HAS1 und HAS2 werden eher konstitutionell exprimiert und spielen in der Inflammation keine bedeutende Rolle. Ihre Aufgabe liegt unter anderem in der Strukturhaltung, was auch die Aufrechterhaltung der Glykokalyx beinhaltet.

Dementsprechend wäre eine isoformspezifische Inhibierung der HA-Synthasen und besonders der Inhibierung der HAS3 zu therapeutischen Zwecken besonders vielversprechend.

Weiterführende Untersuchungen zur Evaluierung des therapeutischen Potentials und/oder des kardiovaskulären Risikos der pharmakologischen Inhibition der HA-Synthese im Detail würden massgeblich von einem konditionalen *knock-out* der HAS-Isoformen oder isoformspezifischen Inhibitoren profitieren.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die kardiovaskulären Nebenwirkungen während der zukünftigen Entwicklung von HA-Synthese Inhibitoren für therapeutische Zwecke sorgsam überprüft werden müssen.

Die pharmakologische Inhibition der HA-Synthese durch 4-MU führt zu einer pathophysiologischen Veränderung des kardiovaskulären Systems und belegt

eindrucksvoll die Bedeutung der Hyaluronsäure für die Aufrechterhaltung einer normalen Gefäßfunktion.

#### 4.11 Ausblick

Da die Forschungsergebnisse der letzten Jahre die Bedeutung der Glykokalyx in der Pathogenese verschiedener vaskulärer Erkrankungen stetig mehr in den Vordergrund rücken, wird nach Möglichkeiten gesucht die Struktur der Glykokalyx zu schützen.

Chappell *et al.*, zeigten 2007, dass Hydrocortison und Antithrombin III über bisher ungeklärte Mechanismen zur Erhaltung einer funktionsfähigen Glykokalyx beitragen<sup>191</sup>. Ein weiterer Ansatz ist die direkte Infusion von Glykokalyxbestandteilen um so die vasoprotektive Struktur der Glykokalyx zu regenerieren. Rubio-Gayosso *et al.* konnten nachweisen, dass durch die Infusion von Hyaluronsäure kurz nach Ischämie des *M. cremaster* von Mäusen die beeinträchtigte vaskuläre Barriere der Glykokalyx nahezu vollständig wiederherstellen konnten<sup>218</sup>. In einer weiteren Studie wurde mithilfe der Intravitalmikroskopie gezeigt, dass infundierte Heparansulfate und Heparin sich an die Gefäßwand anlagern und die geschädigte Glykokalyx wieder aufbauen konnten<sup>201</sup>.

Die Entwicklung von Wirkstoffen, die zum Erhalt einer intakten Glykokalyx beitragen, könnten einen Beitrag zur Gefäßprotektion leisten. Eine pharmakologische Protektion der Glykokalyx könnte zu einer verbesserten Behandlung verschiedener vaskulärer Erkrankungen und ihren Folgen beitragen.

## 5 Zusammenfassung

Hyaluronsäure (HA) ist ein bedeutender Bestandteil atherosklerotischer Läsionen, vermittelt neointimale Expansion und fördert die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen. Andererseits ist Hyaluronsäure ein integraler Bestandteil der vasoprotektiven endothelialen Glykokalyx.

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die Effekte einer chronischen pharmakologischen Inhibition der HA-Synthese auf Atherosklerose und Gefäßfunktion untersucht. ApoE-defiziente Mäuse, die ein fett- und cholesterinreiches Futter erhielten, wurden ab einem Alter von vier Wochen oral mit 4-Methylumbelliferon (4-MU), einem Inhibitor der HA-Synthese, behandelt. Anschließend wurde der Plaquebesatz der Aorta und die Plaquefläche des Aortenursprungs im Alter von 8, 15 und 25 Wochen bestimmt. Bei dem 25 Wochen Untersuchungszeitpunkt konnte eine deutliche Steigerung der Atherosklerose festgestellt werden, die mit einer Anhäufung von mac2-positiven Makrophagen in den atherosklerotischen Läsionen einherging. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Acetylcholin-abhängige Vasorelaxation von isolierten Aortenringen verschlechtert, und der systolische Blutdruck unter Einfluss von 4-Methylumbelliferon erhöht war. Mit Hilfe des Modells der photochemisch induzierten Thrombose konnte eine verstärkte Thromboseneigung unter Einfluss von 4-MU gezeigt werden. Der pro-thrombotische Status wurde weder durch eine erhöhte Plättchenaktivität, bestimmt durch CD62P Expression, noch durch eine veränderte Thrombinaktivität, bestimmt durch die Messung des endogenen Thrombinpotentials, ausgelöst. Der Effekt von 4-MU auf die Volumenexpansion atherosklerotischer Plaques war spezifisch für die Atherosklerose da 4-MU auf die Neointimahyperplasie, ausgelöst durch die Ligatur der linken *A. carotis*, keine Effekte hatte. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von myokardialen Kapillaren zeigten eine Schädigung der endothelialen Glykokalyx unter dem Einfluss von 4-MU.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die systemische Inhibition der Hyaluronsäure-Synthese zu einer beschleunigten Atherosklerose führt. Als mögliche Ursache wird der Verlust der vasoprotektiven endothelialen Glykokalyx durch 4-Methylumbelliferon angenommen.



## 6 Summary

Hyaluronan (HA) is thought to mediate neointimal expansion and to facilitate smooth muscle cell migration and proliferation. On the other hand HA is an integral component of the endothelial glycocalyx mediating vasoprotection.

The present study examines for the first time the effects of chronic pharmacologic inhibition of HA synthesis, on atherosclerosis and vascular function. ApoE-deficient mice on a high-fat and cholesterol-rich Western-diet were treated orally with 4-methylumbelliferone (4-MU), an inhibitor of HA-synthesis, beginning at four weeks of age. Subsequently, aortic atherosclerotic plaque burden and plaque size at the aortic root level were determined at 8, 15 and 25 weeks of age. Atherosclerosis was markedly increased at 25 weeks and accumulation of mac2-positive macrophages was increased in the lesions. Furthermore, acetylcholine dependent relaxation of aortic rings was decreased and mean arterial blood pressure was increased in response to 4-MU. The model of photochemically induced thrombosis revealed a pro-thrombotic state under 4-MU treatment, that was not due to increased platelet activation as determined by CD62P expression and did not reflect increased thrombin activity as monitored by the endogenous thrombin potential. Furthermore, the lesion promoting effect of 4-MU was specific for atherosclerosis since 4-MU did not accelerate neointimal hyperplasia in response to ligation of the left carotid artery. Electron microscopy of myocardial capillaries revealed a severely damaged endothelial glycocalyx after 4-MU treatment.

The data suggest that systemic inhibition of HA synthesis by 4-MU accelerates atherosclerosis possibly due to ablation of the protective function of the endothelial glycocalyx.

## 7 Literatur

1. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-126.
2. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-874.
3. Kuo CC, Gown AM, Benditt EP, Grayston JT. Detection of Chlamydia pneumoniae in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscler Thromb*. 1993;13(10):1501-1504.
4. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362(6423):801-809.
5. Farb A, Kolodgie FD, Hwang JY, Burke AP, Tefera K, Weber DK, Wight TN, Virmani R. Extracellular matrix changes in stented human coronary arteries. *Circulation*. 2004;110(8):940-947.
6. Kolodgie FD, Burke AP, Wight TN, Virmani R. The accumulation of specific types of proteoglycans in eroded plaques: a role in coronary thrombosis in the absence of rupture. *Curr Opin Lipidol*. 2004;15(5):575-582.
7. Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension*. 1986;8(1):37-44.
8. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 1994;78(6):915-918.
9. Rao GH, Krishnamurthi S, Raji L, White JG. Influence of nitric oxide on agonist-mediated calcium mobilization in platelets. *Biochem Med Metab Biol*. 1990;43(3):271-275.
10. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(11):4651-4655.
11. Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem*. 1992;267(25):18148-18153.
12. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993;329(27):2002-2012.
13. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*. 1999;43(3):562-571.
14. Wolfort RM, Stokes KY, Granger DN. CD4+ T lymphocytes mediate hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction via a NAD(P)H oxidase-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294(6):H2619-2626.
15. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001;104(4):503-516.

16. Libby P. What have we learned about the biology of atherosclerosis? The role of inflammation. *Am J Cardiol.* 2001;88(7B):3J-6J.
17. Libby P. Atherosclerosis: the new view. *Sci Am.* 2002;286(5):46-55.
18. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J.* 1999;138(5 Pt 2):S419-420.
19. Owens GK, Vernon SM, Madsen CS. Molecular regulation of smooth muscle cell differentiation. *J Hypertens Suppl.* 1996;14(5):S55-64.
20. Wight TN. Cell biology of arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis.* 1989;9(1):1-20.
21. Zhu Y, Boros DL. Fibronectin co-stimulates via the alpha 5 beta 1 receptor IL-2, IL-4 production by splenic, granuloma lymphocytes of *Schistosoma mansoni* infected mice. *Scand J Immunol.* 1996;43(6):633-639.
22. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992;69(1):11-25.
23. Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Weber DK, Kutys R, Wight TN, Virmani R. Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions: insights into plaque erosion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(10):1642-1648.
24. Vogel KG, Paulsson M, Heinegard D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J.* 1984;223(3):587-597.
25. Fischer JW, Kinsella MG, Levkau B, Clowes AW, Wight TN. Retroviral overexpression of decorin differentially affects the response of arterial smooth muscle cells to growth factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(5):777-784.
26. Nagy N, Melchior-Becker A, Fischer JW. Long-term treatment with the AT1-receptor antagonist telmisartan inhibits biglycan accumulation in murine atherosclerosis. *Basic Res Cardiol.* 2009.
27. Kresse H, Hausser H, Schönherr E, Bittner K. Biosynthesis and interactions of small chondroitin/dermatan sulphate proteoglycans. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1994;32(4):259-264.
28. Raman R, Sasisekharan V, Sasisekharan R. Structural insights into biological roles of protein-glycosaminoglycan interactions. *Chem Biol.* 2005;12(3):267-277.
29. Lipowsky HH. Microvascular rheology and hemodynamics. *Microcirculation.* 2005;12(1):5-15.
30. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch.* 2000;440(5):653-666.

31. Rapraeger A. Transforming growth factor (type beta) promotes the addition of chondroitin sulfate chains to the cell surface proteoglycan (syndecan) of mouse mammary epithelia. *J Cell Biol.* 1989;109(5):2509-2518.
32. Ihrcke NS, Wrenshall LE, Lindman BJ, Platt JL. Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions. *Immunol Today.* 1993;14(10):500-505.
33. Mulivor AW, Lipowsky HH. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(5):H1672-1680.
34. Rapraeger A, Jalkanen M, Endo E, Koda J, Bernfield M. The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans. *J Biol Chem.* 1985;260(20):11046-11052.
35. Carey DJ. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J.* 1997;327 ( Pt 1):1-16.
36. Fransson LA, Belting M, Cheng F, Jonsson M, Mani K, Sandgren S. Novel aspects of glypican glycobiology. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(9):1016-1024.
37. Iozzo RV. Perlecan: a gem of a proteoglycan. *Matrix Biol.* 1994;14(3):203-208.
38. Kinsella MG, Bressler SL, Wight TN. The regulated synthesis of versican, decorin, and biglycan: extracellular matrix proteoglycans that influence cellular phenotype. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2004;14(3):203-234.
39. Sperandio M. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS J.* 2006;273(19):4377-4389.
40. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha5beta3 integrin, and GPIbalpha. *J Exp Med.* 1998;187(3):329-339.
41. Ruegg C, Mariotti A. Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(6):1135-1157.
42. Müller AM, Hermanns MI, Cronen C, Kirkpatrick CJ. Comparative study of adhesion molecule expression in cultured human macro- and microvascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol.* 2002;73(3):171-180.
43. Henry CB, Duling BR. Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *Am J Physiol.* 1999;277(2 Pt 2):H508-514.
44. Vink H, Duling BR. Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278(1):H285-289.
45. van Haaren PM, VanBavel E, Vink H, Spaan JA. Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(6):H2848-2856.

46. Rehm M, Zahler S, Lotsch M, Welsch U, Conzen P, Jacob M, Becker BF. Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed. *Anesthesiology*. 2004;100(5):1211-1223.
47. Jacob M, Bruegger D, Rehm M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. Contrasting effects of colloid and crystalloid resuscitation fluids on cardiac vascular permeability. *Anesthesiology*. 2006;104(6):1223-1231.
48. Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*. 1995;75(3):519-560.
49. Dewey CF, Jr., Bussolari SR, Gimbrone MA, Jr., Davies PF. The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng*. 1981;103(3):177-185.
50. Florian JA, Kosky JR, Ainslie K, Pang Z, Dull RO, Tarbell JM. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ Res*. 2003;93(10):e136-142.
51. Mochizuki S, Vink H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Spaan JA, Kajiya F. Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(2):H722-726.
52. van den Berg BM, Spaan JA, Rolf TM, Vink H. Atherogenic region and diet diminish glycocalyx dimension and increase intima-to-media ratios at murine carotid artery bifurcation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(2):H915-920.
53. Tarbell JM, Pahakis MY. Mechanotransduction and the glycocalyx. *J Intern Med*. 2006;259(4):339-350.
54. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 5):853-865.
55. Lin X. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development*. 2004;131(24):6009-6021.
56. Shimada K, Kobayashi M, Kimura S, Nishinaga M, Takeuchi K, Ozawa T. Anticoagulant heparin-like glycosaminoglycans on endothelial cell surface. *Jpn Circ J*. 1991;55(10):1016-1021.
57. Tovar AM, de Mattos DA, Stelling MP, Sarcinelli-Luz BS, Nazareth RA, Mourao PA. Dermatan sulfate is the predominant antithrombotic glycosaminoglycan in vessel walls: implications for a possible physiological function of heparin cofactor II. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1740(1):45-53.
58. Quinsey NS, Greedy AL, Bottomley SP, Whisstock JC, Pike RN. Antithrombin: in control of coagulation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(3):386-389.
59. Egbrink MG, Van Gestel MA, Broeders MA, Tangelder GJ, Heemskerk JM, Reneman RS, Slaaf DW. Regulation of microvascular thromboembolism in vivo. *Microcirculation*. 2005;12(3):287-300.

- 
60. Nieuwdorp M, Meuwese MC, Vink H, Hoekstra JB, Kastelein JJ, Stroes ES. The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 2005;16(5):507-511.
  61. Lee JY, Spicer AP. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12(5):581-586.
  62. Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(7):528-539.
  63. Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem.* 1997;272(22):13997-14000.
  64. Schulz T, Schumacher U, Prehm P. Hyaluronan export by the ABC transporter MRP5 and its modulation by intracellular cGMP. *J Biol Chem.* 2007;282(29):20999-21004.
  65. Prehm P, Schumacher U. Inhibition of hyaluronan export from human fibroblasts by inhibitors of multidrug resistance transporters. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(7):1401-1410.
  66. Gouverneur M, Spaan JA, Pannekoek H, Fontijn RD, Vink H. Fluid shear stress stimulates incorporation of hyaluronan into endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290(1):H458-452.
  67. van den Boom M, Sarbia M, von Wnuck Lipinski K, Mann P, Meyer-Kirchrath J, Rauch BH, Grabitz K, Levkau B, Schrör K, Fischer JW. Differential regulation of hyaluronic acid synthase isoforms in human saphenous vein smooth muscle cells: possible implications for vein graft stenosis. *Circ Res.* 2006;98(1):36-44.
  68. Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y, Ohnuki Y, Miyauchi S, Spicer AP, McDonald JA, Kimata K. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem.* 1999;274(35):25085-25092.
  69. Itano N, Sawai T, Miyaishi O, Kimata K. Relationship between hyaluronan production and metastatic potential of mouse mammary carcinoma cells. *Cancer Res.* 1999;59(10):2499-2504.
  70. Evanko SP, Angello JC, Wight TN. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(4):1004-1013.
  71. Evanko SP, Wight TN. Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells. *J Histochem Cytochem.* 1999;47(10):1331-1342.
  72. Riessen R, Wight TN, Pastore C, Henley C, Isner JM. Distribution of hyaluronan during extracellular matrix remodeling in human restenotic arteries and balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation.* 1996;93(6):1141-1147.
  73. Sussmann M, Sarbia M, Meyer-Kirchrath J, Nusing RM, Schrör K, Fischer JW. Induction of hyaluronic acid synthase 2 (HAS2) in human vascular smooth muscle cells by vasodilatory prostaglandins. *Circ Res.* 2004;94(5):592-600.

- 
74. Cuff CA, Kothapalli D, Azonobi I, Chun S, Zhang Y, Belkin R, Yeh C, Secreto A, Assoian RK, Rader DJ, Pure E. The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation. *J Clin Invest.* 2001;108(7):1031-1040.
  75. Nasreen N, Mohammed KA, Hardwick J, Van Horn RD, Sanders K, Kathuria H, Loghmani F, Antony VB. Low molecular weight hyaluronan induces malignant mesothelioma cell (MMC) proliferation and haptotaxis: role of CD44 receptor in MMC proliferation and haptotaxis. *Oncol Res.* 2002;13(2):71-78.
  76. Kothapalli D, Zhao L, Hawthorne EA, Cheng Y, Lee E, Pure E, Assoian RK. Hyaluronan and CD44 antagonize mitogen-dependent cyclin D1 expression in mesenchymal cells. *J Cell Biol.* 2007;176(4):535-544.
  77. Stern R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur J Cell Biol.* 2004;83(7):317-325.
  78. Csoka AB, Frost GI, Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol.* 2001;20(8):499-508.
  79. Lepperdinger G, Strobl B, Kreil G. HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. *J Biol Chem.* 1998;273(35):22466-22470.
  80. Atmuri V, Martin DC, Hemming R, Gutsol A, Byers S, Sahebjam S, Thliveris JA, Mort JS, Carmona E, Anderson JE, Dakshinamurti S, Triggs-Raine B. Hyaluronidase 3 (HYAL3) knockout mice do not display evidence of hyaluronan accumulation. *Matrix Biol.* 2008;27(8):653-660.
  81. Culty M, Nguyen HA, Underhill CB. The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J Cell Biol.* 1992;116(4):1055-1062.
  82. Bourguignon LY, Singleton PA, Diedrich F, Stern R, Gilad E. CD44 interaction with Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem.* 2004;279(26):26991-27007.
  83. Lepperdinger G, Mullegger J, Kreil G. Hyal2--less active, but more versatile? *Matrix Biol.* 2001;20(8):509-514.
  84. Rai SK, Duh FM, Vigdorovich V, Danilkovitch-Miagkova A, Lerman MI, Miller AD. Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(8):4443-4448.
  85. Udabage L, Brownlee GR, Nilsson SK, Brown TJ. The over-expression of HAS2, Hyal-2 and CD44 is implicated in the invasiveness of breast cancer. *Exp Cell Res.* 2005;310(1):205-217.
  86. Udabage L, Brownlee GR, Waltham M, Blick T, Walker EC, Heldin P, Nilsson SK, Thompson EW, Brown TJ. Antisense-mediated suppression of hyaluronan

- synthase 2 inhibits the tumorigenesis and progression of breast cancer. *Cancer Res.* 2005;65(14):6139-6150.
87. Herrlich P, Zoller M, Pals ST, Ponta H. CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes. *Immunol Today.* 1993;14(8):395-399.
  88. Lesley J, Hyman R, Kincade PW. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol.* 1993;54:271-335.
  89. Lesley J, Schulte R, Hyman R. Binding of hyaluronic acid to lymphoid cell lines is inhibited by monoclonal antibodies against Pgp-1. *Exp Cell Res.* 1990;187(2):224-233.
  90. Haynes BF, Liao HX, Patton KL. The transmembrane hyaluronate receptor (CD44): multiple functions, multiple forms. *Cancer Cells.* 1991;3(9):347-350.
  91. Jalkanen S, Jalkanen M. Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol.* 1992;116(3):817-825.
  92. Sherman L, Sleeman J, Herrlich P, Ponta H. Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Curr Opin Cell Biol.* 1994;6(5):726-733.
  93. Entwistle J, Zhang S, Yang B, Wong C, Li Q, Hall CL, A J, Mowat M, Greenberg AH, Turley EA. Characterization of the murine gene encoding the hyaluronan receptor RHAMM. *Gene.* 1995;163(2):233-238.
  94. Hall CL, Wang C, Lange LA, Turley EA. Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinase activity. *J Cell Biol.* 1994;126(2):575-588.
  95. Turley EA. Molecular mechanisms of cell motility. *Cancer Metastasis Rev.* 1992;11(1):1-3.
  96. Turley EA. Hyaluronan and cell locomotion. *Cancer Metastasis Rev.* 1992;11(1):21-30.
  97. Lokeshwar VB, Selzer MG. Differences in hyaluronic acid-mediated functions and signaling in arterial, microvessel, and vein-derived human endothelial cells. *J Biol Chem.* 2000;275(36):27641-27649.
  98. Hardwick C, Hoare K, Owens R, Hohn HP, Hook M, Moore D, Cripps V, Austen L, Nance DM, Turley EA. Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. *J Cell Biol.* 1992;117(6):1343-1350.
  99. Hall CL, Turley EA. Hyaluronan: RHAMM mediated cell locomotion and signaling in tumorigenesis. *J Neurooncol.* 1995;26(3):221-229.
  100. Jiang D, Liang J, Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, Prestwich GD, Mascarenhas MM, Garg HG, Quinn DA, Homer RJ, Goldstein DR, Bucala R, Lee PJ, Medzhitov R, Noble PW. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med.* 2005;11(11):1173-1179.



101. Taylor KR, Trowbridge JM, Rudisill JA, Termeer CC, Simon JC, Gallo RL. Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem.* 2004;279(17):17079-17084.
102. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 2002;195(1):99-111.
103. Kohda D, Morton CJ, Parkar AA, Hatanaka H, Inagaki FM, Campbell ID, Day AJ. Solution structure of the link module: a hyaluronan-binding domain involved in extracellular matrix stability and cell migration. *Cell.* 1996;86(5):767-775.
104. Watanabe H, Cheung SC, Itano N, Kimata K, Yamada Y. Identification of hyaluronan-binding domains of aggrecan. *J Biol Chem.* 1997;272(44):28057-28065.
105. Kahmann JD, O'Brien R, Werner JM, Heinegard D, Ladbury JE, Campbell ID, Day AJ. Localization and characterization of the hyaluronan-binding site on the link module from human TSG-6. *Structure.* 2000;8(7):763-774.
106. Wight TN, Merrilees MJ. Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ Res.* 2004;94(9):1158-1167.
107. Price RD, Myers S, Leigh IM, Navsaria HA. The role of hyaluronic acid in wound healing: assessment of clinical evidence. *Am J Clin Dermatol.* 2005;6(6):393-402.
108. Fam H, Bryant JT, Kontopoulou M. Rheological properties of synovial fluids. *Biorheology.* 2007;44(2):59-74.
109. Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med.* 1997;242(1):27-33.
110. De Reeder EG, Girard N, Poelmann RE, Van Munsteren JC, Patterson DF, Gittenberger-De Groot AC. Hyaluronic acid accumulation and endothelial cell detachment in intimal thickening of the vessel wall. The normal and genetically defective ductus arteriosus. *Am J Pathol.* 1988;132(3):574-585.
111. Levesque H, Girard N, Maingonnat C, Delpech A, Chauzy C, Tayot J, Courtois H, Delpech B. Localization and solubilization of hyaluronan and of the hyaluronan-binding protein hyaluronectin in human normal and arteriosclerotic arterial walls. *Atherosclerosis.* 1994;105(1):51-62.
112. Day AJ, Prestwich GD. Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. *J Biol Chem.* 2002;277(7):4585-4588.
113. Ohno S, Ijuin C, Doi T, Yoneno K, Tanne K. Expression and activity of hyaluronidase in human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol.* 2002;73(11):1331-1337.
114. Dai G, Freudenberg T, Zipper P, Melchior A, Grether-Beck S, Rabausch B, de Groot J, Twarock S, Hanenberg H, Homey B, Krutmann J, Reifemberger J, Fischer JW. Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic acid

- from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic acid synthases. *Am J Pathol.* 2007;171(5):1451-1461.
115. Brown MP, Trumble TN, Sandy JD, Merritt KA. A simplified method of determining synovial fluid chondroitin sulfate chain length. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15(12):1443-1445.
116. Brown MP, Trumble TN, Plaas AH, Sandy JD, Romano M, Hernandez J, Merritt KA. Exercise and injury increase chondroitin sulfate chain length and decrease hyaluronan chain length in synovial fluid. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15(11):1318-1325.
117. Canapp SO, Cross AR, Brown MP, Lewis DD, Hernandez J, Merritt KA, Tran-Son-Tay R. Examination of synovial fluid and serum following intravenous injections of hyaluronan for the treatment of osteoarthritis in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2005;18(3):169-174.
118. Knudson W, Biswas C, Li XQ, Nemec RE, Toole BP. The role and regulation of tumour-associated hyaluronan. *Ciba Found Symp.* 1989;143:150-159; discussion 159-169, 281-155.
119. Li XQ, Thonar EJ, Knudson W. Accumulation of hyaluronate in human lung carcinoma as measured by a new hyaluronate ELISA. *Connect Tissue Res.* 1989;19(2-4):243-253.
120. McCarthy MT, Toole BP. Membrane-associated hyaluronate-binding activity of chondrosarcoma chondrocytes. *J Cell Physiol.* 1989;141(1):191-202.
121. Toole BP, Munaim SI, Welles S, Knudson CB. Hyaluronate-cell interactions and growth factor regulation of hyaluronate synthesis during limb development. *Ciba Found Symp.* 1989;143:138-145; discussion 145-139 281-135.
122. Delpech B, Maingonnat C, Girard N, Chauzy C, Maunoury R, Olivier A, Tayot J, Creissard P. Hyaluronan and hyaluronectin in the extracellular matrix of human brain tumour stroma. *Eur J Cancer.* 1993;29A(7):1012-1017.
123. Merzak A, Koocheckpour S, Pilkington GJ. CD44 mediates human glioma cell adhesion and invasion in vitro. *Cancer Res.* 1994;54(15):3988-3992.
124. Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, Kosma VM. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J Pathol.* 1997;182(3):318-324.
125. Toole BP, Hascall VC. Hyaluronan and tumor growth. *Am J Pathol.* 2002;161(3):745-747.
126. Calabro A, Oken MM, Hascall VC, Masellis AM. Characterization of hyaluronan synthase expression and hyaluronan synthesis in bone marrow mesenchymal progenitor cells: predominant expression of HAS1 mRNA and up-regulated hyaluronan synthesis in bone marrow cells derived from multiple myeloma patients. *Blood.* 2002;100(7):2578-2585.

127. Kimata K, Honma Y, Okayama M, Oguri K, Hozumi M, Suzuki S. Increased synthesis of hyaluronic acid by mouse mammary carcinoma cell variants with high metastatic potential. *Cancer Res.* 1983;43(3):1347-1354.
128. Zhang L, Underhill CB, Chen L. Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behavior. *Cancer Res.* 1995;55(2):428-433.
129. Sugahara KN, Murai T, Nishinakamura H, Kawashima H, Saya H, Miyasaka M. Hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells. *J Biol Chem.* 2003;278(34):32259-32265.
130. Toole BP. Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology.* 2002;12(3):37R-42R.
131. Ghatak S, Misra S, Toole BP. Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem.* 2002;277(41):38013-38020.
132. Ward JA, Huang L, Guo H, Ghatak S, Toole BP. Perturbation of hyaluronan interactions inhibits malignant properties of glioma cells. *Am J Pathol.* 2003;162(5):1403-1409.
133. Baumgartner G, Gomar-Hoss C, Sakr L, Ulsperger E, Wogritsch C. The impact of extracellular matrix on the chemoresistance of solid tumors--experimental and clinical results of hyaluronidase as additive to cytostatic chemotherapy. *Cancer Lett.* 1998;131(1):85-99.
134. Arnold ML, Grond-Ginsbach C, Kloss M, Di Mascio MT, Veltkamp R, Ringleb P, Lichy C. Pharmacogenetic Testing for Guiding de novo Phenprocoumon Therapy in Stroke Patients. *Cerebrovasc Dis.* 2009;28(5):468-471.
135. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Coumarin (CAS No. 91-64-5) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser.* 1993;422:1-340.
136. Waskowsky WM, Brouwer A, Verheugt FW. [Antithrombotic therapy after myocardial infarction: arguments for the use of acetylsalicylic acid and coumarin derivatives]. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2005;149(2):65-71.
137. Kakizaki I, Kojima K, Takagaki K, Endo M, Kannagi R, Ito M, Maruo Y, Sato H, Yasuda T, Mita S, Kimata K, Itano N. A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. *J Biol Chem.* 2004;279(32):33281-33289.
138. Nakamura T, Takagaki K, Shibata S, Tanaka K, Higuchi T, Endo M. Hyaluronic-acid-deficient extracellular matrix induced by addition of 4-methylumbelliferone to the medium of cultured human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;208(2):470-475.
139. Nakamura T, Funahashi M, Takagaki K, Munakata H, Tanaka K, Saito Y, Endo M. Effect of 4-methylumbelliferone on cell-free synthesis of hyaluronic acid. *Biochem Mol Biol Int.* 1997;43(2):263-268.

140. Nakamura T, Ishikawa T, Nanashima N, Miura T, Nozaka H, Nakaoka R, Sato T. 4-Methylumbelliferone induces the expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase in cultured human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;298(5):646-650.
141. Kudo D, Kon A, Yoshihara S, Kakizaki I, Sasaki M, Endo M, Takagaki K. Effect of a hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, on B16F-10 melanoma cell adhesion and locomotion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;321(4):783-787.
142. Rilla K, Pasonen-Seppanen S, Rieppo J, Tammi M, Tammi R. The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone prevents keratinocyte activation and epidermal hyperproliferation induced by epidermal growth factor. *J Invest Dermatol.* 2004;123(4):708-714.
143. Yoshihara S, Kon A, Kudo D, Nakazawa H, Kakizaki I, Sasaki M, Endo M, Takagaki K. A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits liver metastasis of melanoma cells. *FEBS Lett.* 2005;579(12):2722-2726.
144. Tofuku K, Yokouchi M, Murayama T, Minami S, Komiya S. HAS3-related hyaluronan enhances biological activities necessary for metastasis of osteosarcoma cells. *Int J Oncol.* 2006;29(1):175-183.
145. Hajime M, Shuichi Y, Makoto N, Masanori Y, Ikuko K, Atsushi K, Mutsuo S, Keiichi T. Inhibitory effect of 4-methylesculetin on hyaluronan synthesis slows the development of human pancreatic cancer in vitro and in nude mice. *Int J Cancer.* 2007;120(12):2704-2709.
146. Nakamura R, Kuwabara H, Yoneda M, Yoshihara S, Ishikawa T, Miura T, Nozaka H, Nanashima N, Sato T, Nakamura T. Suppression of matrix metalloproteinase-9 by 4-methylumbelliferone. *Cell Biol Int.* 2007;31(9):1022-1026.
147. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science.* 1992;258(5081):468-471.
148. Kumar A, Lindner V. Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(10):2238-2244.
149. Sommeijer DW, van Oerle R, Reitsma PH, Timmerman JJ, Meijers JC, Spronk HM, ten Cate H. Analysis of blood coagulation in mice: pre-analytical conditions and evaluation of a home-made assay for thrombin-antithrombin complexes. *Thromb J.* 2005;3:12.
150. Puchtler H, Waldrop FS, Valentine LS. Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. *Beitr Pathol.* 1973;150(2):174-187.
151. Krege JH, Hodgin JB, Hagaman JR, Smithies O. A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension.* 1995;25(5):1111-1115.

152. Wilson KM, Lynch CM, Faraci FM, Lentz SR. Effect of mechanical ventilation on carotid artery thrombosis induced by photochemical injury in mice. *J Thromb Haemost.* 2003;1(12):2669-2674.
153. Zimmermann N, Wenk A, Kim U, Kienzle P, Weber AA, Gams E, Schrör K, Hohlfeld T. Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation.* 2003;108(5):542-547.
154. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, Lecompte T, Beguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003;33(1):4-15.
155. Luft JH. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed Proc.* 1966;25(6):1773-1783.
156. Tabas I, Williams KJ, Boren J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation.* 2007;116(16):1832-1844.
157. Harmon KJ, Couper LL, Lindner V. Strain-dependent vascular remodeling phenotypes in inbred mice. *Am J Pathol.* 2000;156(5):1741-1748.
158. Toole BP, Slomiany MG. Hyaluronan, CD44 and Emmprin: partners in cancer cell chemoresistance. *Drug Resist Updat.* 2008;11(3):110-121.
159. Wight TN. Arterial remodeling in vascular disease: a key role for hyaluronan and versican. *Front Biosci.* 2008;13:4933-4937.
160. Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro A, Jr., Kubalak S, Klewer SE, McDonald JA. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest.* 2000;106(3):349-360.
161. Nakazawa H, Yoshihara S, Kudo D, Morohashi H, Kakizaki I, Kon A, Takagaki K, Sasaki M. 4-methylumbelliferone, a hyaluronan synthase suppressor, enhances the anticancer activity of gemcitabine in human pancreatic cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006;57(2):165-170.
162. Rilla K, Tiihonen R, Kultti A, Tammi M, Tammi R. Pericellular hyaluronan coat visualized in live cells with a fluorescent probe is scaffolded by plasma membrane protrusions. *J Histochem Cytochem.* 2008;56(10):901-910.
163. Evanko SP, Johnson PY, Braun KR, Underhill CB, Dudhia J, Wight TN. Platelet-derived growth factor stimulates the formation of versican-hyaluronan aggregates and pericellular matrix expansion in arterial smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys.* 2001;394(1):29-38.
164. Evanko SP, Tammi MI, Tammi RH, Wight TN. Hyaluronan-dependent pericellular matrix. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(13):1351-1365.
165. de La Motte CA, Hascall VC, Calabro A, Yen-Lieberman B, Strong SA. Mononuclear leukocytes preferentially bind via CD44 to hyaluronan on human

- intestinal mucosal smooth muscle cells after virus infection or treatment with poly(I.C). *J Biol Chem*. 1999;274(43):30747-30755.
166. Kosaki R, Watanabe K, Yamaguchi Y. Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage-independent growth and tumorigenicity. *Cancer Res*. 1999;59(5):1141-1145.
167. Liu N, Gao F, Han Z, Xu X, Underhill CB, Zhang L. Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of TSU prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2001;61(13):5207-5214.
168. Ducale AE, Ward SI, Dechert T, Yager DR. Regulation of hyaluronan synthase-2 expression in human intestinal mesenchymal cells: mechanisms of interleukin-1beta-mediated induction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;289(3):G462-470.
169. Kultti A, Pasonen-Seppanen S, Jauhiainen M, Rilla KJ, Karna R, Pyoria E, Tammi RH, Tammi MI. 4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3. *Exp Cell Res*. 2009;315(11):1914-1923.
170. Evanko SP, Raines EW, Ross R, Gold LI, Wight TN. Proteoglycan distribution in lesions of atherosclerosis depends on lesion severity, structural characteristics, and the proximity of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Am J Pathol*. 1998;152(2):533-546.
171. DeGrendele HC, Estess P, Picker LJ, Siegelman MH. CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J Exp Med*. 1996;183(3):1119-1130.
172. Wilkinson TS, Bressler SL, Evanko SP, Braun KR, Wight TN. Overexpression of hyaluronan synthases alters vascular smooth muscle cell phenotype and promotes monocyte adhesion. *J Cell Physiol*. 2006;206(2):378-385.
173. de la Motte CA, Hascall VC, Drazba J, Bandyopadhyay SK, Strong SA. Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid:polycytidylic acid: inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function. *Am J Pathol*. 2003;163(1):121-133.
174. Fischer JW, Schrör K. Regulation of hyaluronan synthesis by vasodilatory prostaglandins. Implications for atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2007;98(2):287-295.
175. McKee CM, Penno MB, Cowman M, Burdick MD, Strieter RM, Bao C, Noble PW. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest*. 1996;98(10):2403-2413.
176. Rooney P, Kumar S, Ponting J, Wang M. The role of hyaluronan in tumour neovascularization (review). *Int J Cancer*. 1995;60(5):632-636.

177. Lees VC, Fan TP, West DC. Angiogenesis in a delayed revascularization model is accelerated by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan. *Lab Invest.* 1995;73(2):259-266.
178. Chajara A, Levesque H, Courel MN, Chauzy C, Maingonnat C, Bertrand P, Delpech B. Hyaluronan and hyaluronectin production in injured rat thoracic aorta. *Atherosclerosis.* 1996;125(2):193-207.
179. Cipollone F, Prontera C, Pini B, Marini M, Fazia M, De Cesare D, Iezzi A, Uchino S, Boccoli G, Saba V, Chiarelli F, Cuccurullo F, Mezzetti A. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation.* 2001;104(8):921-927.
180. Burleigh ME, Babaev VR, Oates JA, Harris RC, Gautam S, Riendeau D, Marnett LJ, Morrow JD, Fazio S, Linton MF. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Circulation.* 2002;105(15):1816-1823.
181. Chenevard R, Hurlimann D, Bechir M, Enseleit F, Spieker L, Hermann M, Riesen W, Gay S, Gay RE, Neidhart M, Michel B, Luscher TF, Noll G, Ruschitzka F. Selective COX-2 inhibition improves endothelial function in coronary artery disease. *Circulation.* 2003;107(3):405-409.
182. Merrilees MJ, Scott L. Endothelial cell stimulation of smooth muscle glycosaminoglycan synthesis can be accounted for by transforming growth factor beta activity. *Atherosclerosis.* 1990;81(3):255-265.
183. Plenz GA, Deng MC, Robenek H, Volker W. Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis. *Atherosclerosis.* 2003;166(1):1-11.
184. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1995;92(5):1355-1374.
185. Hurt E, Bondjers G, Camejo G. Interaction of LDL with human arterial proteoglycans stimulates its uptake by human monocyte-derived macrophages. *J Lipid Res.* 1990;31(3):443-454.
186. Little PJ, Ballinger ML, Burch ML, Osman N. Biosynthesis of natural and hyperelongated chondroitin sulfate glycosaminoglycans: new insights into an elusive process. *Open Biochem J.* 2008;2:135-142.
187. Huang F, Thompson JC, Wilson PG, Aung HH, Rutledge JC, Tannock LR. Angiotensin II increases vascular proteoglycan content preceding and contributing to atherosclerosis development. *J Lipid Res.* 2008;49(3):521-530.
188. Little PJ, Ballinger ML, Osman N. Vascular wall proteoglycan synthesis and structure as a target for the prevention of atherosclerosis. *Vasc Health Risk Manag.* 2007;3(1):117-124.

189. Savani RC, Wang C, Yang B, Zhang S, Kinsella MG, Wight TN, Stern R, Nance DM, Turley EA. Migration of bovine aortic smooth muscle cells after wounding injury. The role of hyaluronan and RHAMM. *J Clin Invest.* 1995;95(3):1158-1168.
190. Desjardins C, Duling BR. Heparinase treatment suggests a role for the endothelial cell glycocalyx in regulation of capillary hematocrit. *Am J Physiol.* 1990;258(3 Pt 2):H647-654.
191. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Bruegger D, Rehm M, Conzen P, Welsch U, Becker BF. Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology.* 2007;107(5):776-784.
192. Nieuwdorp M, Mooij HL, Kroon J, Atasever B, Spaan JA, Ince C, Holleman F, Diamant M, Heine RJ, Hoekstra JB, Kastelein JJ, Stroes ES, Vink H. Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2006;55(4):1127-1132.
193. Nelson A, Berkestedt I, Schmidtchen A, Ljunggren L, Bodelsson M. Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. *Shock.* 2008;30(6):623-627.
194. Rehm M, Bruegger D, Christ F, Conzen P, Thiel M, Jacob M, Chappell D, Stoeckelhuber M, Welsch U, Reichart B, Peter K, Becker BF. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation.* 2007;116(17):1896-1906.
195. Vlodavsky I, Ilan N, Nadir Y, Brenner B, Katz BZ, Naggi A, Torri G, Casu B, Sasisekharan R. Heparanase, heparin and the coagulation system in cancer progression. *Thromb Res.* 2007;120 Suppl 2:S112-120.
196. Nieuwdorp M, van Haeften TW, Gouverneur MC, Mooij HL, van Lieshout MH, Levi M, Meijers JC, Holleman F, Hoekstra JB, Vink H, Kastelein JJ, Stroes ES. Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo. *Diabetes.* 2006;55(2):480-486.
197. Vlodavsky I, Goldshmidt O, Zcharia E, Atzmon R, Rangini-Guatta Z, Elkin M, Peretz T, Friedmann Y. Mammalian heparanase: involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development. *Semin Cancer Biol.* 2002;12(2):121-129.
198. van den Berg BM, Vink H, Spaan JA. The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. *Circ Res.* 2003;92(6):592-594.
199. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch.* 2007;454(3):345-359.
200. Grundmann S, Schirmer SH, Hekking LH, Post JA, Ionita MG, de Groot D, van Royen N, van den Berg B, Vink H, Moser M, Bode C, de Kleijn D, Pasterkamp G, Piek JJ, Hoefer P. Endothelial glycocalyx dimensions are reduced in



- growing collateral arteries and modulate leukocyte adhesion in arteriogenesis. *J Cell Mol Med*. 2009.
201. Constantinescu AA, Vink H, Spaan JA. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(9):1541-1547.
  202. Chappell D, Jacob M, Rehm M, Stoeckelhuber M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. Heparinase selectively sheds heparan sulphate from the endothelial glycocalyx. *Biol Chem*. 2008;389(1):79-82.
  203. Henry CB, Duling BR. TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(6):H2815-2823.
  204. Marechal X, Favory R, Joulin O, Montaigne D, Hassoun S, Decoster B, Zerimech F, Neviere R. Endothelial glycocalyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory dysfunction and vascular oxidative stress. *Shock*. 2008;29(5):572-576.
  205. Mulivor AW, Lipowsky HH. Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(4):H1282-1291.
  206. Nieuwdorp M, Meuwese MC, Mooij HL, van Lieshout MH, Hayden A, Levi M, Meijers JC, Ince C, Kastelein JJ, Vink H, Stroes ES. Tumor necrosis factor-alpha inhibition protects against endotoxin-induced endothelial glycocalyx perturbation. *Atherosclerosis*. 2009;202(1):296-303.
  207. Lee YH, Kweon SS, Choi JS, Rhee JA, Choi SW, Ryu SY, Shin MH. [Association of blood pressure levels with carotid intima-media thickness and plaques.]. *J Prev Med Public Health*. 2009;42(5):298-304.
  208. Hecker M, Mulsch A, Bassenge E, Busse R. Vasoconstriction and increased flow: two principal mechanisms of shear stress-dependent endothelial autacid release. *Am J Physiol*. 1993;265(3 Pt 2):H828-833.
  209. Pahakis MY, Kosky JR, Dull RO, Tarbell JM. The role of endothelial glycocalyx components in mechanotransduction of fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;355(1):228-233.
  210. Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res*. 2005;96(5):488-500.
  211. Kelly R, Ruane-O'Hara T, Noble MI, Drake-Holland AJ, Snow HM. Differential inhibition by hyperglycaemia of shear stress- but not acetylcholine-mediated dilatation in the iliac artery of the anaesthetized pig. *J Physiol*. 2006;573(Pt 1):133-145.
  212. Vink H, Constantinescu AA, Spaan JA. Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer : implications for platelet-endothelial cell adhesion. *Circulation*. 2000;101(13):1500-1502.
  213. Caro CG, Fitz-Gerald JM, Schroter RC. Arterial wall shear and distribution of early atheroma in man. *Nature*. 1969;223(5211):1159-1160.

- 
- 214.** Hirata Y, Umemura K, Uematsu T, Nakashima M. An experimental myocardial infarction model in the rat and its properties. *Jpn J Pharmacol.* 1995;67(1):51-57.
- 215.** Leidenfrost JE, Khan MF, Boc KP, Villa BR, Collins ET, Parks WC, Abendschein DR, Choi ET. A model of primary atherosclerosis and post-angioplasty restenosis in mice. *Am J Pathol.* 2003;163(2):773-778.
- 216.** Stern R. Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology. *Pathol Biol (Paris).* 2005;53(7):372-382.
- 217.** Simpson MA, Wilson CM, McCarthy JB. Inhibition of prostate tumor cell hyaluronan synthesis impairs subcutaneous growth and vascularization in immunocompromised mice. *Am J Pathol.* 2002;161(3):849-857.
- 218.** Rubio-Gayosso I, Platts SH, Duling BR. Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290(6):H2247-2256.

## 8 Veröffentlichungen

### 8.1 Fachzeitschriften

Marzoll A, Nagy N, Wördehoff L, Fries S, Lindner V, Grosser T, Fischer JW. Cyclooxygenase Inhibitors Repress Vascular Hyaluronan-Synthesis in Murine Atherosclerosis and Neointimal Thickening. *J Cell Mol Med*. 2009. [Epub ahead of print; 2009 Mar 17.]

Nagy N, Melchior-Becker A, Fischer JW. Long-term treatment with the AT1-receptor antagonist telmisartan inhibits biglycan accumulation in murine atherosclerosis. *Basic Res Cardiol*. 2009. [Epub ahead of print; 2009 Aug 23.]

Nadine Nagy, Till Freudenberger, Holger Jastrow, Tatsiana Suvorava, Georg Kojda, Artur A. Weber, Süleyman Ergün, and Jens W. Fischer. Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: Novel insights into the role of hyaluronan synthesis. [submitted]

### 8.2 Kongressbeiträge

Twarock S, Nagy N, Fischer JW. Effects of the hyaluronansynthase inhibitor 4-methylumbelliferone on esophageal squamous cancer cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2007; 375 Suppl 1:67(320).

Nagy N, Melchior A, Fischer JW. Telmisartan reduces atherosclerotic plaque burden and inhibits biglycan expression in apoE-deficient mice. *Annual Meeting of the Society for Microcirculation and Vascular Biology* 2008.

Nagy N, Melchior-Becker A, Fischer JW. Telmisartan inhibits biglycan expression in atherosclerotic plaques in apoE-deficient mice. *Hämostaseologie* 2009; 29:A20.

Nagy N, Melchior-Becker A, Fischer JW. Telmisartan inhibits biglycan expression in atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2009; 379 Suppl 1:35(154).

Nadine Nagy, Ariane Melchior-Becker, Jens W Fischer. Chronic Treatment with the Angiotensin II Receptor I Antagonist, Telmisartan, Inhibits Biglycan Accumulation in Murine Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009; 29;e9-e130 P361

Nadine Nagy, Till Freudenberger, Tatsiana Suvorava, Georg Kojda, Jens W Fischer. Inhibition of Hyaluronan Synthesis by 4-Methylumbelliferone Aggravates Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009; 29;e9-e130 P563

Nagy N, Freudenberger T, Suvorava T, Kojda G, Fischer JW. Systemic hyaluronan inhibition increases atherosclerosis in mice. *E Journal of the British Pharmacological Society* 2009; Volume 7 Issue 1 015P.

Nadine Nagy, Till Freudenberger, Tatsiana Suvorava, Georg Kojda, Jens W. Fischer. Pro-Atherogenic Effect of Hyaluronan Synthesis Inhibition in ApoE-Deficient Mice. Circulation supplement (in press)

## 9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Jens W. Fischer danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die fortwährende Unterstützung dieser Arbeit. Viele anregende Gespräche brachten interessante neue Sichtweisen und Denkansätze hervor. Besonders möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, an nationalen und internationalen wissenschaftlichen Kongressen teilnehmen zu können.

Herrn Prof. Dr. Karsten Schrör danke ich für die freundliche Aufnahme in das Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, sowie für die schönen Kongressabende in Mainz und Wien.

Frau Erika Lohmann und Frau Karin Montag möchte ich für die ständige und freundliche Unterstützung bei der Bewältigung aller organisatorischen Probleme des Institutslebens in Düsseldorf bedanken, sowie Frau Sieberg, Frau Görtz und Frau Lubjuhn die diese Aufgaben am Universitätsklinikum in Essen übernommen haben.

Dr. Holger Jastrow danke ich für die Zusammenarbeit bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Glykokalyx. Dr. Tatsiana Suvorava danke ich für die Zusammenarbeit bei der Messung der Endothelfunktion. Till Freudenberger danke ich für die Zusammenarbeit bei der Messung der Plättchenfunktion und des endogenen Thrombinpotentials, sowie der Flussmessung.

Allen Kollegen und ehemaligen Kollegen danke ich für die sehr nette Arbeitsatmosphäre sowohl in Düsseldorf als auch in Essen, sowie für die schönen Abende, die sicherlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ariane Melchior-Becker danke ich für die Diskussionen und Anregungen im Laboralltag, sowie für Rat und Tat in jeder Lebenslage.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die seelische Unterstützung, sowie meinem Freund Gernot der mich moralisch, ideell und praktisch während der gesamten Zeit unterstützt hat.

## 10 Lebenslauf

### Person

Name	Nadine Nagy
Geburtsdatum	05.01.1981
Geburtsort	Solingen
Nationalität	deutsch

### Promotion

Seit 01/2006	Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer am Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf mit Wechsel an das Institut für Pharmakologie, Universitätsklinikum Essen.
--------------	---

Thema: „Einfluss von 4-Methylumbelliferon, einem Hyaluronsäure-Syntheseinhibitor, auf atherosklerotisch bedingte Gefäßveränderungen ApoE-defizienter Mäuse“

### Studium

09/2005	Abschluss des Studiums mit dem Titel Diplom Biologin
09/2004 – 12/2004	Forschungsaufenthalt in Fortaleza (Brasilien)
09/2004 – 09/2005	Diplomarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Heinz Mehlhorn am Institut für Zoomorphologie, Parasitologie und Zellbiologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf Thema: „Untersuchungen zum Sandfloh <i>Tunga</i> “
10/2000 – 09/2005	Studium der Biologie an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

### Schule

1987 – 1991	Grundschule in Hilden
1991 – 2000	Gymnasium und Abitur am Helmholtz-Gymnasium in Hilden

Essen, den 15.10.2009

## 11 Eidesstattliche Erklärungen

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Einfluss von 4-Methylumbelliferon, einem Hyaluronsäure-Syntheseinhibitor, auf atherosklerotisch bedingte Gefäßveränderungen ApoE-defizienter Mäuse.“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Nadine Nagy befürworte.

Essen, den 15.10.2009

Prof. Dr. Jens W. Fischer

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 15.10.2009

Nadine Nagy

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 15.10.2009

Nadine Nagy